Charakterisierung der (Na^+, K^+)-ATPase und des Na^+/H^+-Austauschers aus dem ionentransportierenden Kiemenepithel der Wollhandkrabbe Eriocheir sinensis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Thomas Bigalke
aus Berlin
1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549614_0034

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33

Charakterisierung der (Na^+,K^+)-ATPase und des Na^+/H^+-Austauschers aus dem ionentransportierenden Kiemenepithel der Wollhandkrabbe Eriocheir sinensis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie
der Freien Universtät Berlin

vorgelegt von
Thomas Bigalke
aus Berlin
1986

Gutachter: Professor Dr. Kai Graszynski, Institut für Tierphysiologie der Freien Universität Berlin, Grunewaldstr. 34, 1000 Berlin 41

Privatdozent Dr. Wolfgang Zeiske, Institut für Tierphysiologie der Freien Universität Berlin, Grunewaldstr. 34, 1000 Berlin 41

Tag der mündlichen Prüfung : 30.7.1986

Inhalt

		Seite
I	Danksagungen	0-4
II	Abkürzungen	0-5
1.	Einleitung	1-1
1.1	Ionenregulation bei Crustaceen	1-1
1.2	Ionentransportsysteme bei Crustaceen	1-4
1.2.1	(Na^+,K^+)-ATPase	1-4
1.2.2	Na^+/H^+-Austauscher	1-5
1.3	Biochemie des Ionentransports	1-8
1.3.1	Die (Na^+,K^+)-ATPase	1-8
1.3.1.1	Kinetische und mechanistische Aspekte der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität	1-9
1.3.1.2	Ein Kanal als Modell für die (Na^+,K^+)-ATPase	1-12
1.3.2	Der Na^+/H^+-Austauscher	1-14
1.4	Die Polarität epithelialer, ionentransportierender Zellen	1-17
1.4.1	Trennung der apikalen und basolateralen Membran	1-17
2.	Frage- und Aufgabenstellung	2-1
3.	Material und Methoden	3-1
3.1	Tiere und Tierhaltung	3-1
3.2	Geräte	3-2
3.3	Chemikalien	3-2
3.4	Präparation der Kiemen	3-3
3.5	Membranpräparation	3-3
3.5.1	Differentialzentrifugation	3-3
3.5.2	Dichtegradientenzentrifugation	3-4
3.5.2.1	Kontinuierlicher Ficoll-Gradient	3-4
3.5.2.2	Ficoll-Stufengradient	3-5
3.5.3.3	Selbstorientierender Percoll-Gradient	3-5
3.5.3	Differentielle Kalziumfällung	3-7
3.6	Proteinbestimmung	3-9

3.7	Bestimmung der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität	3-10
3.7.1	Messung durch Bestimmung des Phosphats	3-10
3.7.2	Messung im ATP-regenerierenden System	3-12
3.8	SDS-Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase	3-13
3.9	Messung der Nukleosid Diphosphatase	3-14
3.10	Messung der Succinat Dehydrogenase	3-15
3.11	Messung der Leucin Arylamidase	3-16
3.12	Messung des Na^+/H^+-Austauschers	3-17
3.12.1	Acridinorange Fluoreszenz-Quench-Technik	3-17
3.12.2	Testansätze für den Na^+/H^+-Austauscher	3-18
3.12.2.1	Messung mit Na^+-beladenen Vesikeln	3-18
3.12.2.2	Messung mit H^+-beladenen Vesikeln	3-21
3.14	Statistik	3-22
4.	Ergebnisse	4-1
4.1	SDS-Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase	4-1
4.1.1	Proteinabhängigkeit der SDS-Aktivierung	4-1
4.1.2	Optimale SDS-Konzentration	4-3
4.1.3	SDS-Aktivierung der Membranfraktionen	4-4
4.1.4	Die Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase in Abhängigkeit vom Außenmedium	4-6
4.2	Isolierung der Zellmembranen	4-8
4.2.1	Differentielle Zentrifugation	4-8
4.2.2	Reinigung der groben Membranfraktion	4-11
4.2.2.1	Selbstorientierender Percoll-Gradient	4-11
4.2.2.2	Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll	4-13
4.2.2.2.1	Ficoll-Stufengradient	4-14
4.2.3	Differentielle Kalziumfällung	4-17
4.3	Charakterisierung der (Na^+,K^+)-ATPase	4-20
4.3.1	Proteinabhängigkeit des (Na^+,K^+)-ATPase-Tests	4-20
4.3.2	pH-Abhängigkeit	4-21
4.3.3	Temperaturabhängigkeit	4-22
4.3.4	Ouabainhemmung der (Na^+,K^+)-ATPase	4-24
4.3.5	Substrat- und Aktivatorabhängigkeit	4-26
4.3.5.1	Mg-ATP-Abhängigkeit	4-26
4.3.5.2	Mg^{2+}-Abhängigkeit	4-28
4.3.5.3	Na^+-Abhängigkeit	4-31
4.3.5.4	K^+-Abhängigkeit	4-34

4.4	Charakterisierung des Na^+/H^+-Austauschers	4-36
4.4.1	Na^+/H^+-Austauscher-Aktivität im Ficoll-Stufengradienten	4-36
4.4.2	Wirkung von Ionophoren auf den Na^+/H^+-Austausch	4-38
4.4.3	Na^+-Abhängigkeit des Na^+/H^+-Austauschers	4-40
4.4.4	Hemmung durch Amilorid	4-45
5.	Diskussion	5-1
5.1	Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase	5-1
5.2	Isolierung der Zellmembranen	5-3
5.3	Eigenschaften der (Na^+,K^+)-ATPase	5-7
5.3.1	pH- und Temperaturabhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase	5-7
5.3.2	Ouabainhemmung	5-8
5.3.3	Mg- und ATP-Abhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase	5-9
5.3.4	Na^+- und K^+-Abhängigkeit	5-11
5.4	Der Na^+/H^+-Austauscher	5-14
5.4.1	Na^+/H^+-Austausch in Zellmembranvesikeln aus Kiemen von Eriocheir sinensis	5-14
5.4.2	Na^+-Abhängigkeit	5-15
5.4.3	Hemmung durch Amilorid	5-16
5.5	Physiologische Funktion der beiden charakterisierten Transportsysteme	5-18
6.	Zusammenfassung	6-1
7.	Literatur	7-1
8.	Lebenslauf	8-1

I Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Graszynski für die Vergabe des Themas und die Betreuung dieser Arbeit. Allen Mitarbeitern des Instituts für Tierphysiologie danke ich für die immer freundliche Hilfsbereitschaft.

Insbesondere bin ich Frau Dr. Gisela Drews, Herrn Dr. Andreas Gies-Reuschel sowie Herrn Dipl. Biol. Peter Krippeit für viele, hilfreiche Diskussionen während des Entstehens dieser Arbeit dankbar.

Frau Anita Johannsen danke ich für die ausgesprochen erfolgreiche praktische und technische Hilfe sowie Frau Claudia Schirmer für die Erstellung einiger Zeichnungen.

Herrn Dr. Gerhard Burckhardt, Max-Plank-Institut für Biophysik, Frankfurt, danke ich für die Beratung und Diskussion bei Problemen im Zusammenhang mit der Isolierung der Zellmembranen und der Messung des Na^+/H^+-Austauschers, sowie für die Durchsicht und Erörterung des Manuskripts dieser Arbeit.

II Abkürzungen

Amil	Amilorid
AO	Acridinorange
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
ATPase	Adenosin 5'-Triphosphatase
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CTP	Cytidin 5'-Triphosphat
DOC	Desoxycholsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H	Homogenat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
g_{av}	Mittlere g-Zahl
IDP	Inosin Diphosphat
INT	2-(p-Iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium Chlorid
ITP	Inosin 5'-Triphosphat
K	Kernfraktion
LAP	Leucin Arylamidase
LDH	Lactat Dehydrogenase
M	Grobe Membranfraktion
Mes	2(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mi	Mitochondrienfraktion
n	Anzahl der Meßdaten
n_H	Hillkoeffizient
$NADH_2$	Nikotinadenindinukleotid, reduziert
NDPase	Nukleosid Diphosphatase
PD_{te}	Transepitheliale Potentialdifferenz
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvat Kinase

RSA	Rinderserumalbumin
S	Überstand
s_m	Standardfehler
SDH	Succinat Dehydrogenase
SDS	Natrium Dodecylsulfat
TMA	Tetramethylammoniumhydroxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
v	Reaktionsgeschwindigkeit
$\bar{x}$	Mittelwert

1. Einleitung

1.1 Ionenregulation bei Crustaceen

Crustaceen besiedeln sehr unterschiedliche Lebensräume. Ein Großteil mariner Arten besitzt aufgrund der konstanten Bedingungen des äußeren Milieus nicht die Fähigkeit zur Osmoregulation, sie sind "Osmokonformer". Im Gegensatz dazu sind Bewohner der Tidenregion sehr wohl zur Osmoregulation in der Lage. Die Ionenkonzentration ihre Hämolymphe entspricht zumeist der des normalen Seewassers. Viele dieser Crustaceenarten haben die Fähigkeit entwickelt, ihre Hämolymphzusammensetzung annähernd konstant zu halten, auch wenn sie verdünntem Seewasser ausgesetzt werden, sie "hyperregulieren" (siehe dazu Lockwood 1977, Mantel & Farmer 1983).

Hyperregulierende Crustaceen, wie z.B. Carcinus maenas, Hemigrapsus nudus, Eriocheir sinensis, Uca minax, Uca pugilator, Uca pugnax und Uca tangeri, sind in verdünnten Medien einem ständigen Ausstrom von Salzen und/oder Einstrom von Wasser ausgesetzt (Schlieper 1929, Jones 1941, Conklin & Krogh 1938, Green et al. 1959, Drews 1985). Sie sind also gezwungen, Ionen, vor allem Na^+ und Cl^-, aus ihrer Umgebung aufzunehmen.

Als Organe, in denen ein ungehinderter Ionentransport stattfinden kann, kommen bei Crustaceen aufgrund ihres verhältnismäßig impermeablen Panzers nur die Antennendrüse, der Darm und die Kiemen in Frage. Die meisten Kurzschwanzkrebse scheiden über die Antennendrüse auch bei Hyperregulation einen zur Hämolymphe isoosmotischen Harn aus (Nagel 1934, Green et al. 1959, Gross 1964, Zanders 1981). Eine Ionenregulationsfähigkeit wird der Antennendrüse nur in Bezug auf zweiwertige Ionen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} zugeschrieben (siehe Mantel & Farmer 1983).

Bisher sind nur wenige Ergebnisse in der Literatur dokumentiert, die auf eine Beteiligung des Darmes an der Ionenregulation hinweisen. Einige Befunde lassen darauf schließen, daß Bereiche des Darmes an der Salzexkretion bei hyporegulierenden

Arten eine Rolle spielt (Green et al. 1959, Dall 1964). Eine isoosmotische Wasserresorption ist im Darm einiger Crustaceen wie Artemia salina, Macrobrachium rosenbergii und Homarus americanus nachgewiesen worden (Croghan 1958a, Ahearn et al. 1977, Mykles 1981). Eine Salzaufnahme, die zur Hyperregulation beiträgt, wurde bisher nicht gezeigt (siehe Mantel & Farmer 1983).

Die hervorragende Stellung beim Ionentransport nehmen die Kiemen ein (siehe Mantel & Farmer 1983, Pequeux & Gilles 1984). Schon Koch (1934) konnte zeigen, daß die Kiemen von E. sinensis an der Salzaufnahme beteiligt sind. Er benutzte dazu die "silver staining" Methode, bei der das ausgefällte $AgCl_2$ die Chlorid-akkumulierenden Bereiche anfärbt. Ähnliche Ergebnisse konnten bei Artemia salina (Croghan 1958b), Gammarus duebeni (Lockwood et al. 1973) und Pacifastacus leniusculus (Morse et al. 1970) erhalten werden. Darüberhinaus ist ein Unterschied in der Färbeintensität der sogenannten "posterioren" (stärker gefärbt) und "anterioren" Kiemen bei einigen Kurzschwanzkrebsen festzustellen, so bei Callinectes sapidus (Copeland & Fitzjarrell 1968) und Eriocheir sinensis (Dehnel 1974, Barra et al. 1983).

In der Feinstruktur zeigen die posterioren Kiemen hyperregulierender Crustaceen ein einschichtiges Epithel, dessen Zellen alle Merkmale, die für den Salztransport typisch sind, aufweisen (Copeland 1967, Copeland & Fitzjarell 1968, Morse et al.1970, Milne & Ellis 1973, Drews 1982, Barra et al. 1983). Die apikalen Zellmembranen bilden mikrovilliähnliche Ausstülpungen, im Bereich ihrer Basis werden oft vesikuläre Strukturen deutlich. Die basalen Einfaltungen reichen tief in das Cytoplasma hinein und sind von einer großen Anzahl Mitochondrien umlagert. Diese Strukturen vermehren sich, je mehr die Tiere zur Hyperregulation veranlaßt werden. Die anterioren Kiemen der Krabben weisen kein derartiges Epithel auf. Ihre Zellen sind erheblich dünner und strukturarm. Diesen Kiemen wird vornehmlich Atmungsfunktion zugeschrieben.

Diese Interpretation der morphologischen Befunde wird durch Untersuchungen gestützt, in denen nachgewiesen wurde, daß Na^+ von isolierten Kiemen in den Hämolymphraum aufgenommen wird (Koch et al. 1954). Bei an Süßwasser adaptierten E. sinensis weisen nur die hinteren Kiemen einen Netto-Influx von Na^+ auf (Pequeux & Gilles 1981). Ein aktiver Salztransport wurde auch in Kiemen anderer Crustaceen gezeigt : Astacus leptodactylus (Bielawski 1964), Callinectes sapidus (Mantel 1967), Carcinus maenas (King & Schoffeniels 1969).

Auch die Messungen transepithelialer Potentialdifferenzen an isolierten Kiemen deuten auf einen Netto-Ionentransport über das Kiemenepithel hin (Croghan et al. 1965, Mantel 1967, Pequeux & Gilles 1978). Den eindeutigen Nachweis eines aktiven Transportpotentials konnten allerdings erst Drews und Graszynski (1984) bei Uca tangeri und Siebers et al. (1985) bei Carcinus meanas in den posterioren Kiemen erbringen. Das Kiemenepithel wurde auf beiden Seiten identischen Salinen ausgesetzt und zeigte unter diesen Bedingungen eine spontane transepitheliale positive Potentialdifferenz bezogen auf die Hämolymphseite. Die Potentialdifferenz ist vollständig durch KCN unterdrückbar. Dieses "Transportpotential" ist daher ATP-abhängig.

1.2 Ionentransportsysteme bei Crustaceen

1.2.1 (Na^+,K^+)-ATPase

In Nervenfasern der Strandkrabbe C. maenas wurde bereits von Skou (1957) eine membrangebundene ATPase beschrieben, für deren Aktivität Na^+,K^+ und Mg^{2+} notwendig sind, und die durch Ca^{2+} gehemmt wird. Skou postulierte einen Zusammenhang zwischen dem Transport von Na^+ und K^+ durch die Zellmembranen und diesem Enzym. Die (Na^+,K^+)-ATPase ist inzwischen in einer großen Anzahl ionentransportierender Gewebe nachgewiesen worden. Auch die Identität dieser ATPase mit dem Transportsystem ist eindeutig geklärt (siehe dazu Abschnitt 1.3.1).

In den Kiemen von Crustaceen ist die (Na^+,K^+)-ATPase erstmalig von Quinn & Lane (1966) nachgewiesen worden. Ein Zusammenhang zwischen der Transportleistung der Kiemen und der (Na^+,K^+)-ATPase wird nicht zuletzt deshalb immer wieder diskutiert, weil bei hyperregulierenden Arten nach Adaptation an verdünnte Medien ein Anstieg der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität festzustellen ist, so z.B. bei C. sapidus (Towle 1974, Mantel & Olsen 1976), C. maenas (Mantel & Landesman 1977, Siebers et al. 1982), Thalamita crenata und Panopeus herbstii (McDanough Spencer et al. 1979), U. pugilator (Graszynski et al. 1979) und E. sinensis (Pequeux & Gilles 1977).

Bei den Kurzschwanzkrebsen zeigt sich auch hier wieder ein deutlicher Unterschied zwischen den anterioren und posterioren Kiemen. In den hinteren Kiemen ist die (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität wesentlich höher als in den vorderen (Neufeld & Pritchard 1978, Pequeux & Gilles 1978, McDanough Spencer et al. 1979, Neufeld et al. 1980, Drews et al. 1981, Wanson et al. 1984, Holliday 1985). Die Aktivitätszunahme, hervorgerufen durch die Adaptation an verdünntes Medium, tritt bei diesen Krabben in besonderem Maße in den hinteren Kiemen auf.

Die Lokalisation der (Na^+,K^+)-ATPase in den Epithelzellen der Kiemen konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden, da histochemische Untersuchungen nicht vorliegen. Jedoch geben Untersuchungen, in denen der spezifische Hemmstoff der (Na^+,K^+)-ATPase Ouabain (g-Strophantin) eingesetzt wurde, wichtige Hinweise. So läßt sich das aktive Transportpotential von U. tangeri- und C. maenas-Kiemen um ca. 60 bzw. 70 % durch Ouabaingabe von der Hämolymphseite (= basolateral) reduzieren. Von der Badseite her hat Ouabain keine Wirkung. Die Wegnahme von K^+ an der basolateralen Seite bewirkt eine noch stärkere Reduktion des Potentials (Drews 1985, Krippeit, persönl. Mitteilung). Sowohl der Cl^-- als auch der Na^+-Influx bei isolierten perfundierten Kiemen von C. maenas werden durch basolaterale Ouabaingabe gehemmt (Siebers & Winkler 1985). Diese Befunde weisen auf eine Lokalisation der (Na^+,K^+)-ATPase in der basolateralen Zellmembran hin. In fast allen transportierenden Epithelien ist die (Na^+,K^+)-ATPase in diesem Bereich der Plasmamembran der Zellen enthalten (Dibona & Mills 1979, Ernst & Mills 1980).

1.2.2 Na^+/H^+-Austausch

Schon Krogh (1938) postulierte, daß die aktive Aufnahme von Na^+ und Cl^- bei hyperregulierenden Krebsen und Fischen an den Austausch gegen Ionen gleicher Ladung gebunden ist. Er schlug vor, daß Ammonium und/oder H^+-Ionen gegen Na^+ ausgetauscht werden. Seitdem sind immer wieder Versuche unternommen worden, diese Hypothese zu verifizieren.

Für ammoniotelische Tiere wie Teleostier und Crustaceen bietet sich anscheinend NH_4^+ als adäquates Austauschion für Na^+ an. (Für den Bereich der Fische siehe Maetz 1974, Kirschner 1979) Einige Befunde deuten auch bei Crustaceen auf diesen Mechanismus hin. So steigt z. B. die NH_4^+-Abgabe von C. sapidus an, wenn die Tiere an verdünntes Meerwasser adaptiert werden (Magnum et al. 1976). Hohe Konzentrationen von Amilorid, einem Hemmstoff von Na^+-Kanälen und des Na^+/H^+-Austauschs (siehe Benos 1982), hemmen sowohl die Na^+-Aufnahme als auch die NH_4^+-

Abgabe der Krabbe (Pressley et al. 1981). Wenn der Transport von Ammonium untersucht wird, müssen einige physikochemische Parameter des Verhaltens von NH_3 und NH_4^+ in Betracht gezogen werden: der respiratorische Transport des gelösten NH_3-Gases, der Puffereffekt und das Säure-Basengleichgewicht von NH_3/NH_4^+ sowie das Verhalten der rein ionischen Form NH_4^+. Besteht ein genügend hohes Partialdruckgefälle für NH_3 über ein Epithel, so läßt sich die Ammoniumabgabe von im Wasser lebenden Tieren allein durch passive Diffusion des Ammoniaks erklären, zumal der Diffusionskoeffizient von NH_3 dem des CO_2 entspricht (Radford 1964). Ein hohes Partialdruckgefälle ist zu erwarten, da in natürlichen Gewässern die Ammoniumkonzentration zwischen 0.1 und 0.001 mmol/l liegt, die in der Hämolymphe von C. sapidus z.B. bei 0.82 mmol/l (Kormanik & Cameron 1981). Beim physiologischen pH zwischen 7,5 bis 8,0 liegen immer einige Prozent des gesamten Ammoniumgehaltes als NH_3 vor, sodaß keine Notwendigkeit zum Transport von NH_4^+ besteht (siehe Cameron & Heisler 1983). Mit diesen Überlegungen stimmen Versuchsergebnisse gut überein, die zeigen, daß der NH_4^+-Efflux weitgehend unabhängig von der externen Na^+-Konzentration ist, jedoch die Erhöhung des externen pHs zur Erniedrigung des Ammoniumausstroms führt (Kormanik & Cameron 1981). Auch daß kein stöchiometrisches Verhältnis zwischen dem Na^+-Influx und NH_4^+-Efflux besteht, deutet eher auf unabhängige Mechanismen hin (Ehrenfeld 1974, Kirschner et al. 1974). Fluxmessungen an isolierten, durchströmten Kiemen von E. sinensis erbrachten ein Na^+ : NH_4^+ Verhältnis der Transportraten von 10 : 1 bei niedrigen Na-Konzentrationen im Bad, bei hohen Na-Konzentrationen verändert sich das Verhältnis weiter zu Gunsten des Na^+ (Pequeux & Gilles 1981).

Für einen Na^+/H^+-Austauschmechanismus sprechen einige Befunde. Werden hyperregulierende Krebse an verdünnte Medien angepaßt, geraten sie in Alkalose (Weiland & Magnum 1975, Truchot 1981, Henry & Cameron 1982). Eine erhöhte Protonensekretion ist festzustellen (Truchot 1981, Ehrenfeld 1974). Wenn Amilorid in Konzentrationen über 10^{-4} mol/l von außen verabreicht wird, geht der Na^+-Nettoinflux bei Flußkrebsen auf nahe Null zurück.

Gleichzeitig wird die Protonennettoexkretion ebenfalls zu 100 % gehemmt(Kirschner et al. 1973, Ehrenfeld 1974). An isolierten Kiemen sind bisher nur wenige Untersuchungen bekannt. Die badseitig positive, transpitheliale Potentialdifferenz von posterioren Kiemen aus U. tangeri steigt nach Amiloridzugabe von außen an (Drews 1985). Dieses Ergebnis wird als ein Hinweis auf einen zum Teil vom Cl^- unabhängigen Na^+-Transport gewertet. Zu dieser Hypothese paßt auch, daß Amilorid den Na^+-Nettoinflux bei isolierten Kiemen von C. maenas auf ca. 30 % reduziert, die Chloridaufnahme aber kaum beeinflußt wird (Siebers, persönliche Mitteilung).

Zur Lokalisation eines möglichen Na^+/H^+-Austauschsystems in den Epithelzellen der Kiemen sind keine Untersuchungen bekannt. Als Hinweis für eine apikale Lage des Systems kann nur die auf von außen beschränkte Wirkung des Amilorids auf den Na-Transport genommen werden (Drews 1985, Siebers, pers. Mitlg.). Ebenso fehlt bisher ein direkter Nachweis des Na^+/H^+-Austauschers in den Kiemen oder anderen Organen der Crustaceen.

1.3 Biochemie des Ionentransports

1.3.1 Die (Na^+,K^+)-ATPase

Nachdem Skou (1957) eine membrangebundene ATPase nachgewiesen hatte, die von Mg^{2+}, Na^+ und K^+ abhängig ist, vermutete er eine Beziehung des Enzyms zum aktiven Transport von Na^+. Später stellte Skou (1965) eine Reihe von Kriterien auf, die erfüllt sein müssen, damit die Identität des Transportsystems mit der Na^+-, K^+- und Mg^{2+}-aktivierten ATPase angenommen werden kann.

1. Enzym und Transportsystem müssen in der gleichen Zellmembran lokalisiert sein.
2. Die Affinität für Na^+ muß auf der Innenseite der Zellmembran deutlich höher sein als die für K^+.
3. Auf der Außenseite der Zellmembran müssen umgekehrt die Affinitäten für K^+ höher sein als für Na^+.
4. Das Transportsystem muß die katalytische Hydrolyse von ATP bewirken und die dabei frei werdende Energie zum Transport der Ionen durch die Membran verwenden können.
5. Die Rate der ATP-Hydrolyse muß von der Na^+-Konzentration innerhalb und der K^+-Konzentration außerhalb der Zelle abhängen.
6. Das Enzym muß in allen Zellen nachweisbar sein, die einen gekoppelten Na^+ / K^+-Transport aufweisen.
7. Der Effekt von Herzglykosiden (Ouabain) auf das Enzym sollte eng mit dem auf den Kationentransport in der intakten Zelle korrelieren.
8. Enzymsystem und Transportsystem müssen bei gleichen Na^+/K^+ Konzentrationsverhältnissen ihre Aktivitätsoptima haben.

In der Zwischenzeit sind diese Forderungen durch eine Vielzahl von Untersuchungsergebnissen bestätigt worden (siehe dazu Skou 1965, Bonting 1970, Dahl & Hokin 1974, Glynn & Karlish 1975,Schuurmans Stekhoven & Bonting 1981). Der direkte Nachweis, daß die (Na^+,K^+)-ATPase Na^+ und K^+ über Membranen transportiert, gelang durch den Einbau des Enzyms aus dem

elektrischen Organ des Aals (Racker & Fisher 1975), der Rektaldrüse des Hais (Hilden & Hokin 1976) und des äußeren Marks der Säugetierniere (Anmer et al. 1977, Goldin 1977) in künstliche Phospholipidvesikel.

1.3.1.1 Kinetische und mechanistische Aspekte der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität

Man kann die (Na^+,K^+)-ATPase als Enzym betrachten, das die Hydrolyse des Substrats ATP katalysiert und dabei durch verschiedene, kationische Kofaktoren beeinflußt wird. Bei Transportuntersuchungen müssen die Alkalimetallionen als Substrate bzw. Produkte angesehen werden. Unter diesem Gesichtspunkt wird z.B. Na^+ vom Substrat zum Produkt umgewandelt, indem es vom Inneren der Zelle nach außen transportiert wird. Der Transportvorgang ist also in diesem Fall der enzymatische Prozeß.

ATP-Abhängigkeit :
Das bevorzugte Substrat der (Na^+,K^+)-ATPase ist ATP, gleichwohl können andere Nukleotide wie z.B. ITP und CTP auch hydrolysiert werden, wenn auch mit geringerer Affinität und Aktivität (Matsui & Schwartz 1966, Schoner et al. 1967). Obwohl ATP wie auch Mg^{2+} für die ATPase-Aktivität notwendig sind, ist bisher noch nicht völlig klar, ob der Mg-ATP Komplex oder ATP allein das eigentliche Substrat darstellt. Kinetische Untersuchungen unterstützen die These, daß Mg-ATP das Substrat ist (Robinson 1974a, Hexum et al. 1970). Jedoch ist eine ATP-Bindung auch unter Mg^{2+}-freien Bedingungen möglich, sie wird durch K^+ und Ouabain gehemmt (Hegyvary & Post 1971). Ist ATP erst einmal gebunden, kann durch Zugabe von Mg^{2+} und Na^+ das energiereiche Phosphoenzym-Intermediärprodukt entstehen (Skou 1974).

Na^+-und K^+-Abhängigkeit :
In Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} haben Na^+ und K^+ keinen Effekt auf den 1. Reaktionsschritt (siehe S. 1-11), die Bildung des ATP-Enzym-Komplexes E_1 ATP (Shamoo & Brodsky 1972). Für den 2.

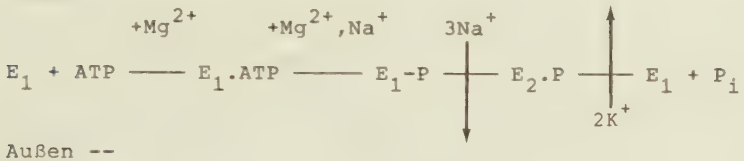
Schritt der Reaktion, der Bildung eines energiereichen Phosphoenzym-Intermediärproduktes E_1-P, ist die Anwesenheit von Mg^{2+} und Na^+ erforderlich. Das Zwischenprodukt stellt eine energiereiche Phosphatverbindung dar, da es mit ADP zu ATP und freiem Enzym reagiert (Fahn et al. 1966, Post et al. 1969). Wird Na^+ oder Mg^{2+} durch Ca^{2+} ersetzt, sammelt sich dieses Zwischenprodukt an (Tobin et al. 1973). Dadurch läßt sich die hemmende Wirkung von Ca^{2+} auf die (Na^+,K^+)-ATPase erklären.

Der 3. Reaktionsschritt wird durch eine Veränderung der Affinitäten des Enzyms für Na^+ und K^+ charakterisiert. Die Affinität für Na^+ sinkt, während die für K^+ steigt. Dieses Verhalten geht mit einer Konformationsänderung (E_1 nach E_2) einher, die die Na^+-Bindungsstelle von innen nach außen bewegen soll (Siegel & Albers 1967, Karlish et al. 1978). Das neue Phosphoenzym E_2~P hat die höhere K^+-Affinität und erscheint nicht mehr energiereich, da es nicht mit ADP zu ATP reagieren kann (Post et al. 1969, Robinson 1976).

Der letzte Reaktionsabschnitt (4.) beinhaltet eine K^+-aktivierte Dephosphorylierung sowie eine 2. Konformationsänderung des Enzyms. Die K^+-Bindungsstelle wird von außen nach innen bewegt, so daß das Enzym in seinen ursprünglichen Zustand E_1 zurückversetzt wird (Siegel & Albers 1967, Karlish et al. 1978).

Die Reaktionen der (Na^+,K^+)-ATPase, als Transportenzym betrachtet, haben einen gerichteten Charakter, aufgrund dessen die Beteiligung der einzelnen Reaktionspartner auf der jeweiligen Seite der Membran zu berücksichtigen ist. ATP und Mg^{2+} reagieren auf der Innenseite der Zellmembran (Sen & Post 1964). Das Enzym und der Na^+/K^+ Austausch werden von Na^+ an der Innenseite und von K^+ an der Außenseite aktiviert (Glynn 1961, Garrahan & Glynn 1967). In Phospholipidvesikel rekonstruierte, gereinigte (Na^+,K^+)-ATPase transportiert unter Verbrauch von 1 ATP-Molekül 3 Na^+ gegen 2 K^+ (Sweadner & Goldin 1975, Hilden & Hokin 1975). Ähnliche stöchiometrische Verhältnisse werden auch in intakten Zellen gefunden.

Schema des Reaktionsmechanismus :



Die Hemmung durch Ouabain :

Die Hemmung der (Na^+,K^+)-ATPase durch Ouabain oder andere Digitalis-Glykoside ist äußerst spezifisch. Andere membrangebundene Transport-ATPasen wie die Ca^{2+}-ATPase und die (H^+,K^+)-ATPase werden durch Ouabain nicht beeinflußt. Die Bindungsstelle für Ouabain liegt an der Außenseite der Membran (Caldwell & Keynes 1959, Hoffman 1966). Die Hemmwirkung ist dadurch begründet, daß sowohl die ATP-Bindung als auch die Dephosphorylierung des Enzyms verhindert werden (Hansen et al. 1971, Sen et al. 1969). Die Zahl der Ouabainbindungsstellen ist gleich der Zahl der ATP-Bindungs- und Phosphorylierungsstellen, d.h. die Stöchiometrie ist 1 Enzym : 1 Ouabain-Molekül (Erdmann & Schoner 1974). Die unterschiedliche Sensitivität der (Na^+,K^+)-ATPase aus verschiedenen Tierarten und Geweben für Ouabain läßt sich möglicherweise durch stark differierende Stabilitäten des Ouabain-Enzymkomplexes erklären (Tobin & Brody 1972, Tobin et al. 1972).

1.3.1.2 Ein Kanal als Modell für die (Na^+,K^+)-ATPase

Die isolierten Untereinheiten der (Na^+,K^+)-ATPase können, in Lipidmembranen eingebaut, unter bestimmten Bedingungen ionophoretische Eigenschaften haben. Je nach Zusammensetzung der Untereinheiten können mehr oder weniger hohe Na^+ – Spezifitäten erreicht werden (Shamoo & Meyers 1974). Die Stöchiometrie des Na^+/K^+ – Austausches, bei dem 1 ATP-Molekül hydrolysiert wird, ist 3 Na^+ : 2 K^+. Diese Eigenschaften und die meist gefundene Bedingung, daß das native (Na^+,K^+)-ATPase-Molekül höchstens 2 katalytische Untereinheiten aufweist (Atkinson & Gatenby 1971), führen zu dem Modell eines wässrigen Kanals, der alternativ 3 Na^+ oder 2 K^+ halten kann (Levitt 1980).

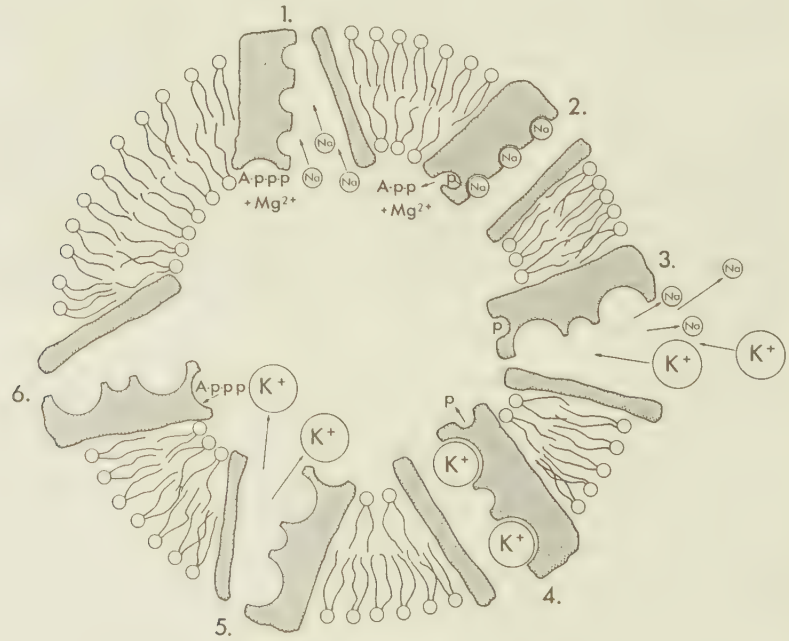


Abb. 1: Schematische Darstellung des Reaktionszykluses eines (Na^+,K^+)-ATPase-Monomers verändert nach Levit (1980), A-PPP = ATP, A-PP = ADP, P = anorganisches Phosphat.

Unter dieses Modell lassen sich so gut wie alle enzymkinetischen und transportierenden Eigenschaften der (Na^+,K^+)-ATPase subsummieren. Der 1. Zustand eines Enzymmonomers wäre danach mit der Fähigkeit charakterisiert, in Anwesenheit von Mg^{2+} und ATP 3 Na^+ aufzunehmen. Wenn alle 3 Na-Ionen gebunden sind, wird (2.) ATP hydrolysiert, und ein energiereiches Phosphointermediärprodukt entsteht. Durch eine Konformationsänderung öffnet sich (3.) der Kanal nach außen, und die Affinität zum Na^+ sinkt drastisch, so daß die Na-Ionen nach außen entlassen werden. Gleichzeitig erhöht sich die Affinität zum K^+, aber wegen sterischer Bedingungen können nur 2 der größeren K-Ionen im Kanal Platz finden. Erst wenn K^+ gebunden ist, kann das Enzym (4.) dephosphoryliert werden, und 5. eine zweite Konformationsänderung durchführen, um sich nach innen zu öffnen, die Affinität zu K^+ zu verringern und damit die K-Ionen abzugeben. Damit wäre dann mit 6. wieder der ursprüngliche Zustand erreicht (siehe Abb.: 1).

Dieses Modell spricht vordergründig für einen konsekutiven, d.h. nacheinander erfolgenden Transport von Na^+ und K^+. Viele Untersuchungsergebnisse sprechen jedoch für einen simultanen Transport. Diese Widersprüchlichkeit kann mit dem Modell in Einklang gebracht werden, bezieht man die Tatsache mit ein, daß die (Na^+,K^+)-ATPase als Dimer vorliegt. Beide katalytische Untereinheiten können sich jeweils in ihrem phosphorylierten Zustand beeinflussen. Der 1. Zustand des Modells sollte danach nur möglich sein, wenn die zweite Untereinheit des Dimers im 4. Stadium ist und umgekehrt (Levitt 1980).

1.3.2 Der Na^+/H^+-Austauscher

Na^+/H^+-Austauschmechanismen, d.h. gleichzeitige Na^+-Aufnahme und H^+-Abgabe, sind in einer Reihe von tierischen Zellen beschrieben worden, so z.B. in kultivierten Fibroblastenzellen (Rothenberg et al. 1983), Neuroblastomazellen (Moolenaar et al. 1981), Nierenzellen (Rindler & Saier 1981), Erythrozyten (Cala 1980), Lymphozyten (Grinstein et al. 1983), Muskelzellen (Frelin et al. 1983) und Seeigelspermatozooen (Lee 1985). Eine Reihe von Funktionen werden dem Na^+/H^+-Austauscher zugeschrieben : z.B. Volumenregulation von Zellen, Regulation der mitogenen Aktivität von Zellen, Säure - Basen Haushalt von Zellen sowie die Beteiligung am Salztransport und der Säure - Basen Regulation ganzer Organismen durch deren epitheliale Zellen. An Bürstensaummembranvesikeln aus dem Dünndarm, dem proximalen Tubulus der Niere von Säugetieren und der Amphibienniere konnte der Mechanismus des Na^+/H^+-Austauschs mit unterschiedlichen Methoden näher untersucht werden (Murer et al. 1976, Kinsella & Aronson 1980, Warnock et al. 1982, Seifter et al. 1981).

Der Transport von Na^+ und H^+ durch den Na^+/H^+-Austauscher ist elektroneutral. Werden Membranen von Vesikeln durch den Kaliumionophor Valinomycin und beidseitig der Membran verteiltes K^+ elektrisch "kurzgeschlossen", wird davon der Na^+/H^+-Austausch nicht beeinflußt (Murer et al. 1976, Kinsella & Aronson 1980, Sabolić & Burckhardt 1983a). Diese Eigenschaft ist durch ein Austauschverhältnis der Ionen von 1 : 1 zu erklären. Dafür spricht auch, daß der Na^+/H^+-Austauscher im Gleichgewicht ist, d.h. kein Na^+- oder H^+-Nettoflux stattfindet, wenn einem beliebig hohen elektrochemischen Gradienten für Na^+ ein ebenso hoher für H^+-Gradient entgegensteht (Kinsella & Aronson 1982). Da die Kinetiken für die Natrium- wie für die Protonenaufnahme eine einfache Sättigung zeigen und außerdem ihr Hillkoeffizient bei 1 liegt, deutet alles auf eine 1 : 1 Stöchiometrie hin (Kinsella & Aronson 1981, Warnock et al. 1982, Aronson et al. 1983).

Der Na^+/H^+-Austauscher der Nierenbürstensaummembran von Säugern hat zusätzlich zu Na^+-Affinitäten zu Li^+, NH_4^+ sowie natürlich zu H^+ (Kinsella & Aronson 1980, Warnock et al. 1982, Sabolić & Burckhardt 1983a). Der Transport dieser Kationen kann in beide Richtungen erfolgen, d. h. er hängt allein vom chemischen Gradienten ab; zusätzlich können sie auch mit sich selbst ausgetauscht werden (Aronson 1983). Für die meisten dieser Kationen scheint es nur eine Bindungsstelle auf beiden Seiten der Membran zu geben. Eine Ausnahme machen wahrscheinlich die Protonen (Aronson et al. 1982), für die es auf der Zytosolseite des Austauschers eine zweite Aktivatorbindungsstelle gibt. Der Na^+-Influx ist daher eine Funktion des Quadrats der internen Protonenkonzentration. Außerdem kann der Na^+-Na^+-Austausch durch eine Erniedrigung des intravesikulären pHs gesteigert werden, obwohl eine einfache Kompetition der beiden Ionen an der zytosolischen Transportbindungsstelle eine Hemmung erwarten ließe. Diese Modifizierungsmöglichkeit durch ein oder mehrere allosterische Zentren für H^+ im Zellinneren ist zellphysiologisch von großer Bedeutung. Eine intrazelluläre Azidose führt somit zu einer erhöhten H^+-Ausscheidung.

Aus den oben genannten Eigenschaften läßt sich ein schematisches Modell des Na^+/H^+-Austauschers entwerfen :

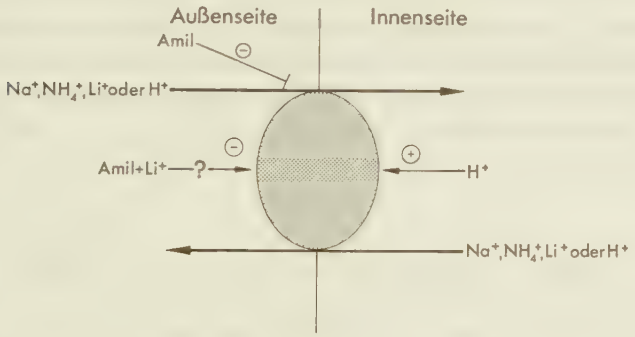


Abb. 2: Schematische Darstellung der Transporteigenschaften des Na^+/H^+-Austauschers verändert nach Aronson (1983), ⊖ = Inhibition, ⊕ = Aktivierung.

Das Diuretikum Amilorid ist ein spezifischer Hemmstoff sowohl von Na-Kanälen als auch des Na^+/H^+-Austauschers (Kinsella & Aronson 1981, Ives et al. 1983). Die Affinität ist deutlich niedriger als zu Na-Kanälen. Die Bindung von Amilorid und damit die Hemmung ist reversibel. Von außen appliziertes Amilorid erniedrigt sowohl den Na^+ Influx als auch den Efflux, d.h. es ist cis- und trans-Inhibition möglich (siehe Aronson 1983, 1985).

Zum Mechanismus der Amiloridhemmung existieren unterschiedliche Ergebnisse. Kinsella und Aronson (1981) fanden eine rein kompetitive Hemmung der Aktivität des Na^+/H^+-Austauschers durch Amilorid. Diese Messungen erfolgten mit Hilfe der schnellen Filtrationsmethode zur Bestimmung der ^{22}Na-Aufnahme in Membranvesikel. Yves et al. (1983a) stellten eine "mixed type" Hemmung fest. Sowohl V_{max} als auch K_m für Na^+ wurden von Amilorid beeinflußt, d.h. es müßten zwei verschiedene Mechanismen der Amiloridhemmung vorliegen. Für den kompetitiven Anteil stellten sie einen K_i fest, der genau mit dem von Kinsella und Aronson übereinstimmt (siehe oben). K'_i, die Hemmkonstante für den nichtkompetitiven Anteil, wurde von ihnen mit 90 µmol/l angegeben. Die letzteren Messungen wurden mit Hilfe der pH abhängigen Aufnahme des fluoreszierenden Amins Acridinorange durchgeführt. Die Autoren stellten ebenfalls eine "mixed type" Hemmung des Na^+/H^+-Austauschers durch Li^+ fest. Diese Ergebnisse deuten auf eine zweite modifizierende Bindungsstelle, die für den nichtkompetitiven Anteil der Amiloridwirkung verantwortlich zeichnet, auch auf der Außenseite der Membran hin.

1.4 Die Polarität epithelialer, ionentransportierender Zellen

Epitheliale Zellen aus Geweben, die am Ionentransport beteiligt sind, weisen in allen tierischen Organismen einen asymmetrischen Aufbau auf. Ein Charakteristikum dieser Zellen besteht in einem elektronenmikroskopisch erkennbaren, unterschiedlichen morphologischen Aufbau der Plasmamembranen, die einerseits mit dem äußeren Medium (apikal) und andererseits mit dem Blut oder der Hämolymphe (basolateral) in Verbindung stehen (siehe Kapitel 1.1).

Dieser polare Aufbau steht in engem Zusammenhang mit dem Mechanismus des transzellulären Transports von in Wasser gelösten Teilchen. Der Transport dieser Teilchen gegen einen elektrochemischen Gradienten erfordert Energie. Ein primär aktiver Mechanismus, gekoppelt an die Hydrolyse von ATP, existiert jedoch nur für wenige Ionen, z.B. Na^+ und Ca^{2+}. Die meisten Stoffe werden sekundär aktiv transportiert. Als ein Beispiel ist der Na - Glukose-Cotransport (Symport) zu nennen (siehe Aronson 1981). In Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere und des Dünndarms baut die in der basolateralen Membran lokalisierte (Na^+,K^+)-ATPase eine elektrochemische Potentialdifferenz für Na^+ über der Zellmembran auf. Der Na - Glukose-Cotransporter, lokalisiert in der apikalen Membran, kann nun, angetrieben durch Na^+, Glukose in der Zelle akkumulieren. Anschließend verläßt die Glukose die Zelle über die basolaterale Membran aufgrund des Konzentrationsgefälles durch einfache Diffusion (siehe Crane 1977). Ähnliche Transportmechanismen sind für eine Vielzahl von Substanzen bekannt (siehe Murer et al. 1983, Murer und Burckhardt 1983, Lerner 1985).

1.4.1 Trennung der apikalen und basolateralen Membran

Die unterschiedlichen funktionalen Eigenschaften der apikalen und basolateralen Membranen epithelialer Zellen machen es wahrscheinlich, daß sie sich ebenfalls in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden. Weil beide Membranbezirke

unterschiedlich funktionierende Teile der selben Plasmamembran sind, müssen sie eine differenzierte Zusammensetzung aufweisen. Die Schwebedichte von Membranpartikeln kann aufgrund verschiedener Lipid : Protein Verhältnisse jeweils eine andere sein. Die Oberflächen der Membranen können unterschiedliche Charakteristika besitzen, z.B. : die Ladungsdichte, das Verhältnis der hydrophoberen zu hydrophilen Gruppen und die Qualität und Quantität der Glykokalix (Murer & Kinne 1980).

Es existieren verschiedene methodische Ansätze, Membranvesikel der apikalen bzw. basolateralen Membran voneinander zu trennen :
Mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese können durch Differentialzentrifugation erhaltene grobe Membranfraktionen getrennt werden (Heidrich et al. 1972). Das Trennprinzip beruht darauf, daß die mehr negativ geladen Vesikel der apikalen Membran im elektrischen Feld weiter zur Anode wandern als die der basolateralen Membran.

Bei der differentiellen Salzfällung mit Ca^{2+} oder Mg^{2+} wird das Gewebehomogenat mehrfach hintereinander mit ca. 10 mmol/l dieser Ionen versetzt und zentrifugiert. Die Trennung soll auf unterschiedlicher Wechselwirkung der Membranoberflächen mit den zweiwertigen Ionen beruhen: Die apikalen Membranen kompensieren die positiven Ladungen durch eine höhere Anzahl negativer Gruppen auf ihrer Oberfläche, während die basolateralen Membranen sowie viele Zellorganellen durch Ca^{2+} und Mg^{2+} aggregieren. Die aggregierten Partikel können bei niederen g-Zahlen sedimentiert werden (Booth & Kenny 1974, Evers et al. 1978).

Die unterschiedliche Schwebedichte der Membranvesikel wird als Trennkriterium bei der Dichtegradientenzentrifugation im Anschluß an eine Differentialzentrifugation verwendet. Besonders vorteilhaft sind Gradientenmaterialien, die es zulassen auch geringe Dichteunterschiede hoch aufzulösen, da die apikalen und basolateralen Membranen, bezogen auf ihre Schwebedichte, kaum unterschiedlich sind. Als das Gradientenmaterial der Wahl

hat sich Percoll (Polyvinylpyrrolidon ummantelte Silikagelkugeln) erwiesen. Mit Percoll ist es möglich, isoosmotische, selbstorientierende Gradienten mit hoher Kapazität und breiter Spreizung des Dichtebereiches zwischen 1.030 g/ml und 1.050 g/ml zu erstellen. Gerade die Spreizung dieses Dichtebereiches ist notwendig, um die sich in dieser Beziehung kaum unterscheidenden Plasmamembranteile voneinander zu trennen (Scalera et al. 1980, Inui et al. 1981, Scalera et al. 1981).

2. Frage- und Aufgabenstellung

Über die molekularen Grundlagen des Ionentransports im Kiemenepithel der Crustaceen gibt es bisher wenig gesicherte Erkenntnisse. Einzig die (Na^+,K^+)-ATPase ist in diesem Zusammenhang im Kiemenepithel nachgewiesen worden. Eine Charakterisierung dieses Enzyms aus Kiemen der Wollhandkrabbe E. sinensis fehlt ebenso wie der Nachweis anderer Ionentransportsysteme bei Crustaceen im Allgemeinen.

Folgende Fragen stehen im Rahmen dieser Arbeit im Vordergrund:

- Wie können Zellmembranen aus den Kiemenepithelzellen isoliert werden?
- Ist es möglich die basolateralen- von den apikalen Zellmembranbereichen zu trennen?
- Welche biochemischen Eigenschaften hat die (Na^+,K^+)-ATPase aus den posterioren Kiemen von E. sinensis?
- Existiert der Na^+/H^+-Austauscher als Transportsystem in den Zellmembranen des Kiemenepithels?
- Welche Eigenschaften hat der Na^+/H^+- Austauscher?

3. Material und Methoden

3.1 Tiere und Tierhaltung

Chinesische Wollhandkrabben Eriocheir sinensis wurden von einem kommerziellen Fischer aus Emden bezogen. Bis zur Durchführung der Experimente wurden die Tiere in fließendem Leitungswasser bei ca. 16°C gehalten. Sie wurden zweimal in der Woche mit Ewos Karpfenfutter (Fa. Bertels GmbH, Ewos Aquaculture International, Halstenbek) gefüttert.

Winkerkrabben Uca pugilator wurden von der Firma Gulf Specimen Inc., Panacea (Florida) bezogen. Bis zum Experiment wurden die Tiere in belüftetem künstlichem Seewasser (Tropic marin neu) mit einem Salzgehalt von 12 g/l bei ca. 16°C in flachen Bassins gehalten. Die Tiere konnten jederzeit das Wasser verlassen. Zierfischfutter der Firma Unizoo wurde zweimal in der Woche gegeben.

Strandkrabben Carcinus maenas wurden von der Biologischen Anstalt Helgoland bezogen. Bis zum Versuch wurden die Tiere in belüftetem künstlichem Seewasser (s.o.) mit einem Salzgehalt von 12 g/l unter kontinuierlicher Filterung eines Aquariumfilters (Eheim) bei ca. 16°C gehalten. Die Tiere wurden zweimal die Woche mit Ewos Karpfenfutter gefüttert.

Während der Adaptation an "normales" Seewasser wurden die Tiere unter den jeweils oben beschriebenen Bedingungen in künstlichem Seewasser mit einem Salzgehalt von 36 g/l mindestens 14 Tage gehalten.

3.2 Geräte

Folgende Geräte wurden benutzt :
Sorvall Kühlzentrifuge RC 5 B, Beckmann Ultrazentrifuge L-5-65, Potter-S-Elvejhem Homogenisator Fa. B. Braun Melsungen mit Teflonstempel und Glashomogenisationsgefäß (enges Abstandsmaß) Ultra-Turrax Homogenisator, Glas-Glas Homogenisator Wheaton, Perkin-Elmer Spektralphotometer UV/VIS 555, Eppendorfphotometer 1101 M mit Küvettenwechselautomaten 2705 und Kompensationsschreiber 6511, Kontron Spektralfluorometer SFM 23 mit temperierbaren Küvettenhalter, LKB Fraktionssammler 7000 Ultrorac mit UV Photometer Uvicord II.

3.3 Chemikalien

Alle analysenreinen Laborchemikalien wurden von Merck Darmstadt oder Serva Heidelberg bezogen, Biochemikalien von Serva Heidelberg, Fluka Ulm oder Sigma München, Acridinorange von Eastman Codak. Percoll und Ficoll wurden von der Fa. Pharmacia bezogen. Amilorid stellte die Fa. Merck-Sharp-Dohme dankenswerter Weise zur Verfügung.

3.4 Präparation der Kiemen

Nach dem Töten der Tiere wurde der Carapax entfernt, um dann die Kiemen mit einer feinen Schere zu entfernen. Es wurden jeweils nur die posterioren Kiemen verwendet. Sofort nach der Entnahme wurden die Kiemen in eiskaltes Homogenisationsmedium gegeben. Bei Eriocheir sinensis und Carcinus maenas wurden jeweils die hinteren 3 Kiemen, während bei Uca pugilator die hinteren 2 Kiemen als posteriore Kiemen definiert wurden (siehe 1.1 und 1.2.1).

3.5 Membranpräparation

Die Kiemen wurden im Homogenisationsmedium (250 mmol/l Saccharose, 20 mmol/l Hepes, 0.4 mmol/l EDTA mit Tris auf pH 7,5 eingestellt) gewaschen und anschließend auf Filterpapier getrocknet, sowie durch Ausdrücken von möglichst viel Hämolymphe befreit.

Ein 10 % (w/v) Homogenat wurde mit Hilfe des Potter Elvejhem bei 1200 U/Min und 25 Hüben hergestellt. Die Filtration des Homogenats erfolgte durch ein Kunststoffgewebe mit einer Maschenweite von ca. 90 µm, das Filtertuch wurde mit dem Volumen des Homogenats (10 - 30 ml) gewaschen.

3.5.1 Differentialzentrifugation

Alle Schritte der differentiellen Zentrifugation erfolgten in der Sorvall RC 5 B Kühlzentrifuge bei 4°C mit den Rotoren SM 24 oder SS 34 je nach Volumen des Homogenates.

Das Rohhomogenat wurde bei 500 x g_{av} 10 Min. zentrifugiert. Der entstandene Niederschlag (Kernfraktion K) wurde je nach Gewebemenge in 4 - 8 ml Homogenisationspuffer mit einem Glas-Glas Homogenisator (Wheaton) resuspendiert.

Der Überstand wurde anschließend bei 5000 x g_{av} 15 Min. erneut zentrifugiert. Das Sediment (Mitochondrienfraktion Mi) wurde in 2 - 4 ml Homogenisationsmedium aufgenommen.

Zur Herstellung einer groben Membranfraktion (M) wurde der resultierende Überstand bei 48000 x g_{av} 60 Min. zentrifugiert. Aliquots des in 4 - 12 ml Homogenisationspuffer resuspendierten Sediments und des Überstandes wurden zur Enzymbestimmung abgenommen. Fraktion M wurde zur weiteren Reinigung verwendet.

3.5.2 Dichtegradientenzentrifugation

Es wurden unterschiedliche Methoden zur weiteren Reinigung der Plasmamembranfraktion M (Proteinkonzentration ca. 3 mg/ml) angewendet. Anschließend werden drei verschiedene Methoden der Dichtegradientenzentrifugation beschrieben.

3.5.2.1 Kontinuierlicher Ficoll-Gradient

Je 10 ml 5 % und 15 % Ficoll 400 in Homogenisationspuffer wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers zu einem kontinuierlichen Gradienten gemischt. Der Dichtebereich dieses Gradienten reichte von 1.052 g/l bis 1.084 g/l. 4 ml der groben Membranfraktion M wurden auf den Gradienten geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 48000 x g_{av} 120 Min. im SS 34 Rotor der Sorvall Kühlzentrifuge. Anschließend wurde der Gradient bei 4°C unter kontinuierlicher Absorptionsmessung bei 280 nm in 3 ml Fraktionen aufgetrennt.

Die Fraktionen wurden danach auf 13 ml aufgefüllt und erneut bei 48000 x g_{av} 60 Min. im SM 24 Rotor zur Konzentrierung der Membranen und Entfernung des Ficoll zentrifugiert. Die erhaltenen Sedimente wurden in 0.4 ml Transportpuffer (siehe 3.12.2.1) mit einer Spritze resuspendiert und auf Eis über Nacht aufbewahrt.

3.5.2.2 Ficoll-Stufengradient

4 ml der resuspendierten Fraktion M wurden auf einen Ficoll 400 Stufengradienten (5 ml 5 % und 8 ml 15 % Ficoll in Homogenisationspuffer) geschichtet und bei 48000 x g 90 Min. im SS 34 Rotor in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. 5 Fraktionen resultierten aus dieser Zentrifugation : die Fraktion G 1 als Überstand, G 2 an der ersten Phasengrenzfläche zum 5 % Ficoll, G 3 5 % Ficoll + Phasengrenzfläche zum 15 % Ficoll, G 4 15 % Ficoll wurden mit einer Spritze abgenommen, das Sediment (Fraktion G 5) sowie die Membranfraktionen G 2 -4 wurden in ca. 36 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und bei 48000 x g_{av} 60 Min. sedimentiert. Die Sedimente wurden in 1 - 2 ml Transportpuffer (siehe 3.12.2.1) mit einer Spritze resuspendiert. Aliquots zur Enzymbestimmung wurden über Nacht bei -18°C eingefroren. Die Reste der Proben wurden zur Na^+/H^+-Austauscher Bestimmung über Nacht im Eisbad aufbewahrt.

3.5.2.3 Selbstorientierender Percoll-Gradient

Literatur : Scalera et al. (1980)
Inui et al. (1981)
Scalera et al. (1981)
Sheikh et al. (1982)

Es wurde eine isoosmotische, 75 % Percoll-Stammlösung aus 1 Teil 4-fach konzentriertem Homogenisationspuffer und 3 Teilen 100 % Percoll-Lösung hergestellt. Aliquots der Fraktion M mit einem Proteingehalt von 15-25 mg wurden mit Homogenisationspuffer und entsprechenden Volumina Percoll-Stammlösung auf 38 ml aufgefüllt und 4 mal bei 1000 U/Min gepottert. Je nach gewünschten Versuchsbedingungen wurden so 8-18 % Percoll-Endkonzentrationen (v/v) erreicht.

Anschließend wurden die so erhaltenen Percoll-Membrangemische im SS 34 Rotor bei 48000 x g_{av} in der Kühlzentrifuge 30 Min. zentrifugiert. Mit Hilfe der "Density Marker Beads" (Fa. Pharmacia, Heidelberg) konnte das Dichteprofil des sich selbst

ausrichtenden Percoll-Gradienten überprüft werden. "Density Marker Beads" sind farbige Sepharosekügelchen, die in gequollenem Zustand eine definierte Dichte haben.

Je nach Experiment wurde der Gradient nach der Zentrifugation durch Unterschichten mit 60 % Saccharoselösung von oben her in 3 ml Fraktionen aufgetrennt, oder die zwei sichtbaren Banden (G I und G II) mit einer Spritze abgesaugt. Um die erhaltenen Fraktionen vom Percoll zu befreien, wurden sie auf mindestens das 3-fache Volumen mit Homogenisationsmedium aufgefüllt und in der Ultra-Zentrifuge im Ti 60 Rotor 90 Min. bei 55 000 U/Min. zentrifugiert. Das Percoll bildete ein festes, glasiges Sediment auf dem die Membranen sedimentierten.

Anschließend wurden die Membranen mit einer Spritze in Transportpuffer (0.5 ml bei 3 ml Fraktionen, G I und G II in 2 - 3 ml) aufgenommen und resuspendiert. Aliquots für die Enzymbestimmungen wurden über Nacht bei -18°C, für die Bestimmung des Na^+/H^+-Austauschers im Eis aufbewahrt.

3.5.3 Differentielle Kalziumfällung

Literatur : Booth & Kenny (1974)
Evers et al. (1978)

2-3 gr (Frischgewicht) Kiemen wurden mit Hilfe des Ultra-Turrax Homogenisators im Homogenisationspuffer (aus 3.5) im Eisbad bei maximaler Drehzahl 2x1 Min. zu einem 10 % (w/v) Homogenat verarbeitet. Sollte bei der Homogenisation gleichzeitig ein osmotischer Schock zur Wirkung kommen, wurde ein Homogenisationspuffer ohne Saccharose verwendet.

Anschließend wurde das Homogenat mit der doppelten Menge aqua dest. und einer entsprechenden Menge 0.5 mol/l $CaCl_2$-Lösung versetzt, sodaß eine Endkonzentration von 10 mmol/l an $CaCl_2$ entstand. Eine Probe zur Enzymbestimmung wurde entnommen.

Nach 15 minütigem, vorsichtigem Rühren mit dem Magnetrührer auf Eis wurde das Homogenat bei 500 x g_{av} im SS 34 Rotor in der Kühlzentrifuge 15 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen (Probe zur Enzymbestimmung P I), der Überstand bei 20500 x g_{av} im SS 34 Rotor 30 Min. zentrifugiert. Der hieraus resultierende Überstand (S I) wurde verworfen. Das Sediment (P II) wurde auf das ursprüngliche Volumen mit dem halbkonzentrierten Homogenisationspuffer (Puffer II) aufgenommen, 10 mal bei 1200 U/Min. mit dem Potter homogenisiert und auf 10 mmol/l $CaCl_2$ Endkonzentration gebracht.

Nach wiederum 15 Min. Rühren wurde bei 750 x g_{av} 15 Min. zentrifugiert. Das Sediment (Probe P III) wurde verworfen, der Überstand bei 20500 x g_{av} 30 Min. nochmals zentrifugiert. Der aus dieser Zentrifugation resultierende Überstand (S II) wurde verworfen, das Sediment mit ca. 30 ml Transportpuffer aufgenommen, 10 mal gepottert und bei 48000 x g_{av} 30 Min. rezentrifugiert. Der Überstand (S III) wurde verworfen, das Sediment (P IV) in 1 ml Transportpuffer mit einer Spritze resuspendiert.

Von allen erhaltenen Sedimenten und den vereinigten Überständen S I, S II und S III wurden Proben zur Bestimmung der Enzymanreicherung und Ausbeute bei -18°C über Nacht aufbewahrt. Der Rest von Fraktion (P IV) wurde zur Bestimmung des Na^+/H^+-Austauschers im Eis aufbewahrt.

3.6 Proteinbestimmung

Literatur : Bradford (1976)
Sedmak & Grossberg (1977)

Für die Proteinbestimmung wurde die Protein-Farbstoff-Bindungsmethode in Anlehnung an Bradford (1976) gewählt. Diese Methode ist einfach, schnell und hat den besonderen Vorteil, sehr empfindlich zu sein.

Reagenzien : 95 % Ethanol
85 % Phosphorsäure
Serva Blau G (entspricht Coomassie Brilliant Blue G 250)

70 mg Serva Blau G wurden in 50 ml 95 % Ethanol gelöst und gefiltert, mit 100 ml 85 % Phosphorsäure versetzt und auf 1 l mit aqua dest. aufgefüllt. Die Endkonzentrationen der Reagenzien in der Farblösung waren : 4.7 % Ethanol, 8.5 % Phosphorsäure, 0.007 % Serva Blau G.

Der Mikroansatz bestand aus 0.1 ml Probe mit einem Proteingehalt von 3-20 µg Protein und 1 ml Farblösung. Bei Proben mit höherer Proteinkonzentration kann das Volumen der Farblösung entsprechend vergrößert werden. 2 - 40 Min. nach gutem Durchrühren konnte die Extinktion gemessen werden. Bei jedem neuen Ansatz der Farblösung wurde das Absorptionsmaximum neu bestimmt; es variierte zwischen 580 und 600 nm Wellenlänge.

Als Standard diente Rinderserumalbumin, dessen Konzentration durch Absorptionsmessung (Extinktionskoeffizient für eine 1 % (w/v) RSA-Lösung = 6.67) bei 279 nm bestimmt wurde.

3.7 Bestimmung der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität

Es kamen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung : 1: Ein Endpunkttest zur Bestimmung des freigesetzten Phosphats; 2: Ein kontinuierlicher Test mit ATP regenerierendem System.

3.7.1 Messung durch Bestimmung des Phosphats

Literatur : Ohnishi et al. (1976)
Weinmann (1980)

Das Prinzip der Messung beruht darauf, daß ATPasen ATP zu ADP hydrolysieren und das frei gewordene, anorganische Phosphat im Anschluß an die Reaktion durch eine kolorimetrische Methode gemessen wird.

Das Herzglykosid Ouabain (g-Strophantin) hemmt die (Na^+,K^+)-ATPase spezifisch. Die Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase wird als die Differenz der Aktivität des Ansatzes ohne Ouabain (Gesamt-ATPase) und des Ansatzes mit Ouabain (Grund- oder Mg-ATPase) definiert.

Endkonzentrationen der Reagenzien im (Na^+,K^+)-ATPase-Testansatz :

100 mmol/l	NaCl	
20 mmol/l	KCl	
4 mmol/l	$MgCl_2$	
50 mmol/l	Hepes	(mit Tris auf pH 7,5)
0/5 mmol/l	Ouabain	
3 mmol/l	ATP	(mit Tris auf pH 7,5)
3-15 µg	Protein	

Volumen des Testansatzes : 300 µl

Reagenzien zur Phosphatbestimmung :

1. 16 mmol/l	Na_2-EDTA
2. 172 mmol/l	Hydroxylammoniumsulfat
1 mmol/l	Polyvinylpyrrolidin
87.5 mmol/l	H_2SO_4
3. 8 %	Ammoniumheptamolybdat
4. 6.75 mol/l	NaOH
50 mmol/l	Na_2CO_3

Die Lösungen 1,2 und 3 wurden jeweils kurz vor dem Test im Verhältnis 2:3:1 gemischt (Stopplösung).

Nach 10 Min. Vorinkubation wurde die Reaktion mit ATP gestartet. Die Reaktionszeit betrug 10 Min. und wurde durch Zugabe von 1 ml Stoppreagenz beendet. Nach weiteren 2 Min. wurde Lösung 4 als Farbentwickler hinzugegeben. Die Extinktion konnte nach 10-45 Min. bei 720 nm gemessen werden. Der Test wurde bei 37°C durchgeführt.

Die Menge des freigesetzten Phosphats wurde mit Hilfe eines KH_2PO_4-Standards bestimmt. Ein Unit (U) der (Na^+,K^+)-ATPase Aktivität wurde als 1 /uMol entstandenes Phosphat / Min. definiert.

3.7.2 Messung im ATP-regenerierenden System

Literatur : Schoner et al. (1967)
Sall et al. (1975)
Weinmann (1980)

Das Prinzip der Messung beruht darauf, daß das durch ATP Hydrolyse entstandene ADP durch das Hilfsenzym Pyruvatkinase zu ATP regeneriert wird, indem die Phosphatgruppe des Phosphoenolpyruvats auf das ADP übertragen wird. Pyruvat wird durch das zweite Hilfsenzym Lactatdehydrogenase zu Lactat umgebildet, das hierbei abnehmende $NADH_2$ wird bei 334 nm photometrisch bestimmt. Die $NADH_2$-Umsetzung und der ATP-Verbrauch erfolgen 1:1.

Auch im ATP-regenerierenden System wurden zwei parallele Testansätze mit und ohne Ouabain (siehe 3.7.1) gefahren.
Endkonzentrationen im Testansatz :

100	mmol/l	NaCl	
20	mmol/l	KCl	
10	mmol/l	$MgCl_2$	
50	mmol/l	Hepes	(mit Tris auf pH 7,5)
0/5	mmol/l	Ouabain	
x	mmol/l	ATP	(mit Tris auf pH 7,5)
2	mmol/l	PEP	
0.3	mmol/l	$NADH_2$	
5.5	U	LDH	
3.3	U	PK	
1-5	/ug	Protein	

Volumen des Testansatzes : 740 /ul
Die Messung erfolgte bei 37°C, die Reaktion wurde mit ATP gestartet.

Ein Unit der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität wurde als 1 /uMol abgebautes $NADH_2$ / Min. definiert.

Diese Meßmethode wurde nur bei Messungen, bei denen die ATP Konzentration variiert wurde, angewendet.

3.8 SDS-Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase

Literatur : Jørgensen (1974a)
Forbush III (1983a)

Durch Detergensbehandlung kann die (Na^+,K^+)-ATPase aktiviert werden. Der Einsatz von SDS hat sich hier als sehr effektiv herausgestellt. Wird RSA dem SDS-enthaltenden Aktivierungsmedium zugesetzt, kann die freie SDS-Konzentration quasi abgepuffert werden. Der sonst sehr enge SDS-Konzentrationsbereich für die optimale (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivierung, abhängig vom Membranprotein zu Detergens Verhältnis, kann hierdurch deutlich verbreitert werden.

Reagenzien :

1.	25 mmol/l	Hepes	(mit Tris auf pH 7.0)
	10 mg/ml	RSA	
	0.65 mg/ml	SDS	
2.	25 mmol/l	Hepes	(mit Tris auf pH 7.0)
	0.3 mg/ml	RSA	

Ein 50 µl Aliquot der Membranfraktionen mit einem Proteingehalt von 10-50 µg wurde mit 100 µl der Lösung 1 gut vermischt und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 600 µl Lösung 2 hinzugegeben, um die SDS-Konzentration zu verringern. Die auf diese Weise behandelten Proben konnten bei nur geringem Aktivitätsverlust bis zu 24 h bei 4°C aufbewahrt werden. Je nach Höhe der Aktivität wurden bis zu 90 µl der aktivierten Proben in den (Na^+,K^+)-ATPase-Test eingesetzt.

Um die optimale Detergenskonzentration im Aktivierungsmedium herauszufinden, wurden für die Kiemenpräparationen der verschiedenen Tiere Tests mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen durchgeführt.

3.8 Messung der Nukleosid-Diphosphatase

Literatur : Novikoff & Heus (1963)

Das Prinzip der Messung beruht darauf, daß die Nukleosid-Diphosphatase (NDPase) von Nukleosid-Diphosphaten einen der beiden Phosphatreste abspaltet. Das bevorzugte Substrat ist IDP.

Endkonzentrationen der Reagenzien im NDPase-Testansatz :

24 mmol/l	Tris	(mit HCl auf pH 7,4)
5 mmol/l	$MgCl_2$	
2.4 mmol/l	IDP	(mit Tris auf pH 7,4)
5-40 µg	Protein	

Volumen des Testansatzes : 300 µl

Nach 10 minütiger Vorinkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit IDP gestartet. Der Enzymtest ist mindestens linear bis 60 Min. Reaktionsdauer, 30 Min. Reaktionszeit wurden jedoch nie überschritten. Nach Beendigung der Reaktion wurde das enzymatisch freigesetzte anorganische Phosphat bestimmt (siehe 3.7.1).

Ein U der NDPase-Aktivität wurde als 1 µmol freigesetztes Phosphat / Min. definiert.

3.9 Messung der Succinat Dehydrogenase

Literatur : Pennington (1961)
Clark & Porteous (1964)
Green & Narahara (1980)

Die Succinat Dehydrogenase kann durch die Reduktion von Tetrazoliumsalzen zu Formazan in Anwesenheit von Succinat gemessen werden. Das Derivat 2-(p-Iodophenyl)-3-(p-Nitrophenyl)-5-Phenyltetrazoliumchlorid (INT) ist für diese Messung aufgrund seiner hohen Reaktivität besonders geeignet. Das schwer wasserlösliche Reaktionsprodukt Formazan muß nach Beendigung der Reaktion mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden, um die entstandene Menge photometrisch messen zu können.

Endkonzentrationen der Reagenzien im Succinat Dehydrogenase Testansatz :

62.5 mmol/l	Saccharose	
50 mmol/l	KH_2PO_4	(mit KOH auf pH 7,4)
50 mmol/l	Succinat	(mit KOH auf pH 7,4)
0.24 mg/ml	INT	

Volumen des Testansatzes : 500 µl
Die Messung erfolgte bei 37°C, die Reaktion wurde mit Succinat gestartet. Nach 10 Min. wurde die Reaktion mit 500 µl 12 % TCA (Endkonzentration 6 %) gestoppt. Durch Zugabe von 1,25 ml Ethylacetat, kräftigem Schütteln und anschließender Zentrifugation bei 1000 x g wurde das gebildete Formazan in die organische Phase extrahiert.

Die Konzentrationsbestimmung des Formazans wurde photometrisch bei 490 nm Wellenlänge (Extinktionskoeffizient in Ethylacetat = 2.0×10^4 l x mol^{-1} x cm^{-1}) durchgeführt. Ein U der Succinat Dehydrogenase Aktivität wurde als 1 µmol entstandenes Formazan / Min. definiert.

3.10 Messung der Leucin Arylamidase

Die Arylamidase katalysiert die hydrolytische Spaltung von Aminosäurearylamiden. Das Enzym kann mit dem künstlichen Substrat L-Leucin-4-nitroanilid gemessen werden.

Der Enzymtest wurde mit einem etwas veränderten Testsatz von Merck (Darmstadt) Merckotest Nr. 3359 Leucin Arylamidase (Optimierter kinetischer Test) durchgeführt.

Endkonzentrationen der Reagenzien im Testansatz :

257	mmol/l	NaCl
51	mmol/l	Tris (pH 7,5)
4.1	mmol/l	L-Leucin-4-nitroanilid

Volumen des Testansatzes : 875 µl
Die Messung erfolgte bei 30°C, die Reaktion wurde mit dem Substrat gestartet.

Die Entstehung des abgespaltenen 4-Nitroanilins wurde kontinuierlich bei 405 nm Wellenlänge (Extinktionskeoffizient = 9.92×10^{3} l x mol^{-1} x cm^{-1}) im temperierten Schreiberphotometer gemessen. Ein U der Leucin Arylamidase-Aktivität wurde als 1 µmol entstandenes 4-Nitroanilin / Min. definiert.

3.12 Messung des Na^+/H^+-Austauschers

Der Na^+/H^+-Austauscher kann prinzipiell durch zwei verschiedene Methoden gemessen werden. Einmal durch die Aufnahme von Radionukliden (z.B. ^{22}Na) unter pH-Gradientenbedingungen und durch die Bestimmung des pH-Werts innerhalb oder außerhalb von Membranvesikeln unter Na-Gradientenbedingungen. In dieser Arbeit wurde die letztere Methode mit Hilfe der Acridinorange-Fluoreszenz-Quench-Technik angewendet.

3.12.1 Acridinorange-Fluoreszenz-Quench-Technik

Literatur : Deamer et al. (1971)
Schuldiner et al. (1971)
Singh & Bragg (1977)
Lee & Forte (1978)
Rabon et al. (1978)

Protonengradienten über Lipidmembranen können durch Fluoreszenzfarbstoffe, die schwache Basen sind, gemessen werden. In der deprotonierten Form sind diese Moleküle gut membrangängig, in der protonierten Form, d. h. in geladenem Zustand, sind diese Moleküle schlecht permeierend. Beide Formen stehen im Gleichgewicht. Werden in einer Lösung Membranvesikel, deren Innenraum einen niedrigeren pH-Wert als das Außenmedium aufweist, suspendiert, sammeln sich diese Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Acridinorange, AO) im Vesikelinneren an. Das ursprüngliche Fluoreszenzsignal wird abgeschwächt (gequencht).

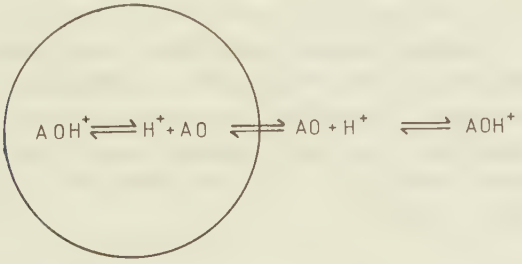


Abb. 3: Schematische Darstellung der AO-Akkumulation in Membranvesikel mit saurem Inneren.

Das Absorbtionsmaximum von AO liegt bei 493 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 525 nm Wellenlänge. Werden Kiemenmembranvesikel, die in einem Puffer mit dem pH 6,5 2 h inkubiert wurden, in einen Puffer pH 8,0 mit 6 µmol/l AO injiziert, wird das Fluoreszenzsignal (100 %) um ca. 20 % gequencht (siehe Abb. 31). Das Signal kann durch das Protonophor CCCP fast vollständig zurückgeführt werden, der pH-Gradient bricht zusammen.

3.12.2 Testansätze des Na^+/H^+-Austauschers

Literatur : Reenstra et al. (1981)
Warnock et al. (1982)
Sabolić & Burckhardt (1983a)

Der Na^+/H^+-Austauscher wurde mit der Methode der Acridinorange Aufnahme in Membranvesikel untersucht. Der Meßansatz kann grundsätzlich auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden: a) indem die Membranvesikel mit Na^+ vorgeladen werden, und b) indem die Membranvesikel mit Protonen vorgeladen werden.

3.12.2.1 Messung mit Na^+-beladenen Vesikeln

Dieser methodische Ansatz geht davon aus, daß der Na^+/H^+-Austauscher in den Vesikelmembranen angetrieben durch einen von innen nach außen gerichteten Na^+-Gradienten, das Innere der Vesikel ansäuert. Die daraus resultierende AO-Aufnahme in die Vesikel führt zur Verringerung der Fluoreszenz. Nachdem sich ein neues Gleichgewicht von Na^+, H^+ und AO über der Vesikelmembran eingestellt hat, kann durch Na^+-Zugabe ein von außen nach innen gerichteter Na^+-Gradient aufgebaut werden. Der oben beschriebene Prozeß wird umgekehrt, Protonen werden im Austausch gegen Na^+ nach außen transportiert, AO erscheint wieder im Inkubationsmedium und das ursprüngliche Fluoreszenzsignal wird wieder erreicht.

Reagenziengemische :

1. Transportpuffer zum Vorladen der Vesikel :

150 mmol/l	Na-Glukonat
10 mmol/l	K-Glukonat
10 mmol/l	Hepes (mit Tris auf pH 7,0)

2. Inkubationspuffer :

150 mmol/l	TMA
150 mmol/l	Glukonsäure-Lakton
10 mmol/l	K-Glukonat
10 mmol/l	Hepes (mit Tris auf pH 7,0)
6 µmol/l	AO
0, 10, 50 oder 100 µmol/l	Amilorid

3. Injektionslösungen (Stammlösungen) :

a)	3 mol/l	Na-Glukonat
	10 mmol/l	Hepes (mit Tris auf pH 7,0)
b)	5 mol/l	NaCl
	10 mmol/l	Hepes (mit Tris auf pH 7,0)
c)	2,5 mol/l	TMA
	2,5 mol/l	Glukonsäure-Lakton
	10 mmol/l	Hepes (mit Tris auf pH 7,0)

Volumen des Testansatzes : 2,0 ml

Die Messung erfolgte bei 25°C in einem temperierten Küvettenhalter unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer in 3 ml Acrylküvetten der Fa. Sarstedt. Die Änderung der Fluoreszenz wurde kontinuierlich mit einem Schreiber aufgezeichnet. Der Inkubationspuffer wurde vor der Messung auf 25°C temperiert.

Die über Nacht im Transportpuffer auf Eis aufbewahrten Membranfraktionen wurden vor der Messung ca. 1 h im Wasserbad bei 25°C inkubiert. Je nach Proteingehalt wurden zwischen 20 und 50 µl Probenvolumina injiziert, sodaß der die Proteinmenge im Testansatz von 40 - 120 µg variierte.

In weiteren Experimenten kamen verschiedene Ionophore zum Einsatz. Sie wurden vor der Injektion der Proben aus Ethanolstammlösungen in den Inkubationspuffer gegeben. Die Ethanolkonzentration überstieg in keinem Fall 0,5 %.

Endkonzentrationen der Ionophore im Testansatz :

2.5 µmol/l	Valinomycin
1.0 µg/ml	Gramicidin
2.5 µmol/l	CCCP

Die Fluoreszenzabschwächung (Quench) wird in % des Fluoreszenzsignals der Kontrollexperimente ohne Na^+ Gradienten angegeben.

In den kinetischen Experimenten wurde die Anfangsgeschwindigkeit des Fluoreszenzanstiegs nach Injektion von verschiedenen Mengen Na-Glukonat oder NaCl als Maß für die Geschwindigkeit des Na^+/H^+-Austausches verwendet. Die Aktivität des Na^+/H^+-Austauschers wird in Fluoreszenzeinheiten / Min (FU) angegeben. Sie wurde während der ersten 4 - 6 sec nach der Na^+-Injektion durch Anlegen einer Tangente an die Schreiberkurven bestimmt.

3.12.2.2 Messung mit H^+-beladenen Vesikeln

Bei dieser Methode werden Vesikel mit saurem inneren Milieu in einen demgegenüber alkalischen Puffer injiziert. Das im Inkubationspuffer enthaltene AO akkumuliert in den Vesikeln. Nach Einstellung des AO Gleichgewichts kann durch Injektion von Na^+ oder anderen Ionen ein Austausch gegen Protonen des Vesikelinneren gemessen werden.

Reagenzgemische :

1. Transportpuffer zum Vorladen der Vesikel :

150 mmol/l	TMA
150 mmol/l	Glukonsäure-Lakton
10 mmol/l	K-Glukonat
5 mmol/l	Hepes
5 mmol/l	Mes (mit Tris auf pH 6,0)

2. Inkubationspuffer :

150 mmol/l	TMA
150 mmol/l	Glukonsäure-Lakton
10 mmol/l	K-Glukonat
10 mmol/l	Hepes (mit Tris auf pH 8,0)
6 µmol/l	AO

Die Injektionslösungen entsprachen denen aus 3.12.2.1 .
Testansatzvolumen und Versuchsbedingungen wie 3.12.2.1 .

Die Anfangsgeschwindigkeit des Fluoreszenzanstiegs nach der Injektion von verschiedenen Kationen wurde als Maß für den Austausch gegen Protonen verwendet.

3.14 Statistik

Literatur : Cavalli-Sforza (1974)

Die Ergebnisdaten werden als Mittelwert ($\bar{x}$) $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes s_m dargestellt.

Zum statistischen Vergleich zweier Stichproben wurde der ungepaarte zweiseitige t-Test nach Student verwendet. Ein signifikanter Unterschied zwischen Mittelwerten zweier Stichproben wurde angenommen, wenn P kleiner als 0,05 war.

Regressionsgeraden wurden nach der Methode der kleinsten Abstandsquadrate berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 SDS-Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase

Die (Na^+,K^+)-ATPase ist ein in der Zellmembran lokalisiertes Enzym. Bei der Homogenisation des Gewebes bilden sich mehr oder weniger dichte Membranvesikel. (Na^+,K^+)-ATPase-Moleküle, die in vesikulären Membranstrukturen enthalten sind, können nicht von allen für ihre Aktivität notwendigen Liganden (ATP, Ouabain, Mg, Na und K) erreicht werden. Vesikel können "right side-out" oder "inside-out" orientiert sein, d.h. die Membranen haben sich mit ihrer zytosolischen Seite im Laufe der Homogenisation nach außen gekehrt oder haben ihre ursprüngliche Orientierung behalten. Je nachdem können entweder Ouabain und Kalium oder ATP, Magnesium und Natrium ihre Bindungsorte frei erreichen. Durch eine milde Detergensbehandlung können die Vesikel aufgebrochen werden, ohne aber die (Na^+,K^+)-ATPase zu inaktivieren. Nunmehr können auch die vorher für Substrate unzugänglichen ATPasen gemessen werden.

4.1.1 Proteinabhängigkeit der SDS-Aktivierung

Normalerweise wird die Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase mit dem Detergens SDS sehr stark vom Verhältnis Protein : SDS beeinflußt. Wird die freie SDS-Konzentration im Aktivierungsmedium mit zugesetztem PCA abgepuffert, kann jedoch die (Na^+,K^+)-ATPase in einem verhältnismäßig weiten Konzentrationsbereich des Probenproteins optimal aktiviert werden.

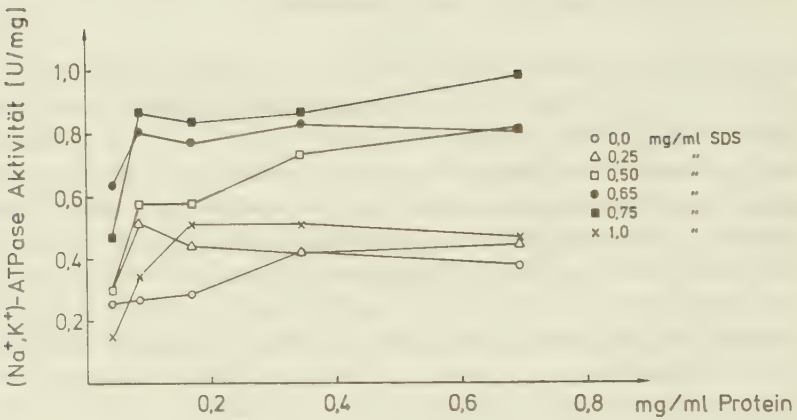


Abb. 4: Einfluß der Membranproteinkonzentration im Aktivierungsmedium (siehe 3.8) auf die spezifische Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase bei verschiedenen SDS-Konzentrationen, x aus Doppelwerten einer Präparation, + 10 mg/ml RSA im Aktivierungsmedium.

In Abb. 4 wird am Beispiel einer groben Membranfraktion der hinteren Kiemen der Strandkrabbe C. maenas gezeigt, daß 0.65 bzw. 0.75 mg/ml SDS in 1% RSA im Bereich von 0.1-0.7 mg/ml Membranprotein im Aktivierungsmedium die gleiche optimale Aktivierung ergeben.

4.1.2 Optimale SDS-Konzentration

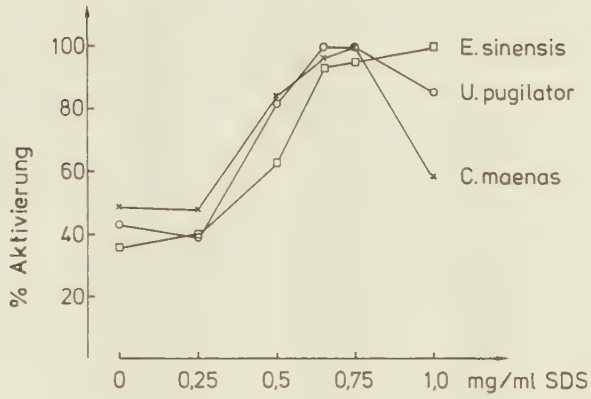


Abb. 5: Einfluß der SDS-Konzentration im Aktivierungsmedium auf die (Na^+,K^+)-ATPase in % der maximalen Aktivität, Fraktion M (siehe 3.5.1), posteriore Kiemen, $\bar{x}$ aus Doppelwerten je einer Präparation, + 10 mg/ml RSA im Aktivierungsmedium.

Um festzustellen, ob die SDS-Konzentration von 0.65 mg/ml auch zur Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase anderer Kurzschwanzkrebse geeignet ist, wurden grobe Membranfraktionen der posterioren Kiemen von C. maenas, U. pugilator und E. sinensis mit unterschiedlichen Detergenskonzentrationen inkubiert. Abb. 5 zeigt, daß der Bereich um 0.7 mg/ml SDS für alle Tiere ähnlich gute Ergebnisse der Aktivierung bringt. Nur bei E. sinensis ist ersichtlich, daß die (Na^+,K^+)-ATPase weniger empfindlich auf hohe SDS-Konzentrationen reagiert.

4.1.3 SDS-Aktivierung der Membranfraktionen

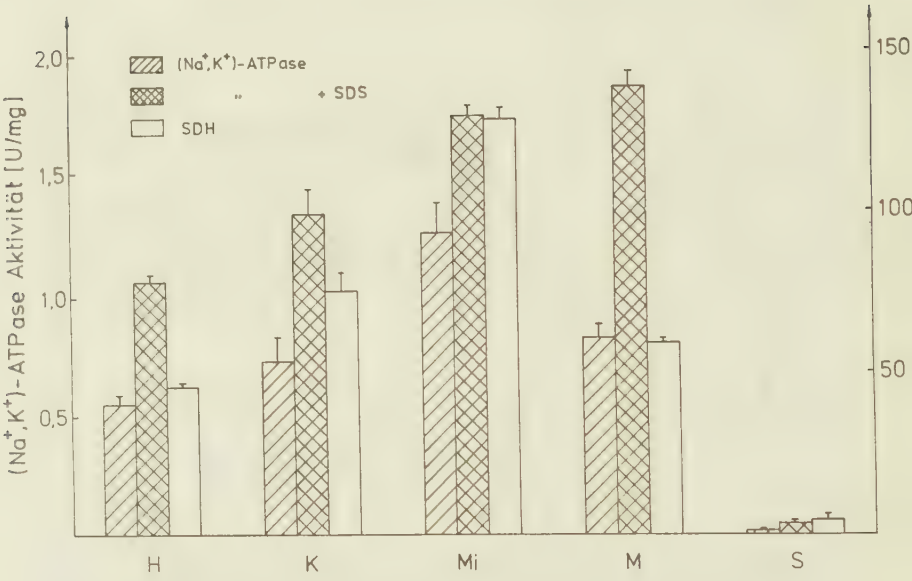


Abb. 6: Verteilung der spezifischen Aktivitäten von SDH und (Na^+,K^+)-ATPase +/- SDS, posteriore Kiemen von U. pugilator, Fraktionen der Differentialzentrifugation siehe 3.5.1, $\bar{x} \pm s_m$ n = 6.

Zur Untersuchung der Verteilung der (Na^+,K^+)-ATPase im Verlauf der differentiellen Zentrifugation (siehe 3.5.1), wurde das Enzym mit und ohne Detergens gemessen. Am Beispiel von U. pugilator sind in Abb. 6 die spezifischen Aktivitäten der (Na^+,K^+)-ATPase +/- SDS und der SDH dargestellt. Insbesondere in der Mitochondrienfraktion (Mi), charakterisiert durch die höchste spezifische Aktivität der SDH, und der groben Membranfraktion (M) sind deutliche Unterschiede in der Verteilung der (Na^+,K^+)-ATPase Aktivität festzustellen. Während das nichtaktivierte Enzym sich ähnlich wie die SDH verteilt, sind die Aktivitäten des aktivierten Enzyms in Fraktion M und Mi gleich. Der durch SDS aktivierbare Anteil der (Na^+,K^+)-ATPase Aktivität ist hier nahezu doppelt so hoch wie in Fraktion Mi.

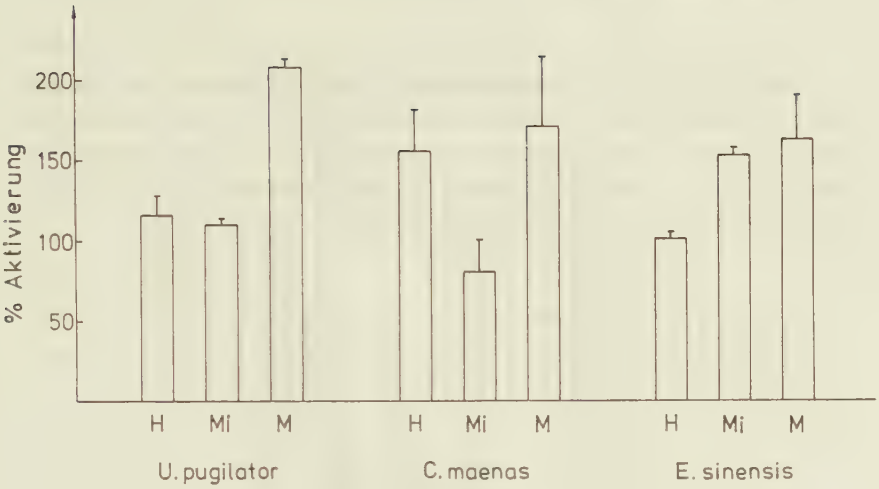


Abb. 7: Verteilung des aktivierbaren Anteils in % der Aktivität ohne SDS der (Na^+,K^+)-ATPase in einigen Fraktionen der Differentialzentrifugation siehe 3.5.1, posteriore Kiemen, $\bar{x} \pm s_m$ n = 3-6.

Bei allen untersuchten Tieren ist die prozentuale Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase in der groben Membranfraktion am höchsten (Abb.: 7). Hier ist die Aktivierung signifikant höher ($p<0.05$) als im Rohhomogenat. Eine Signifikanz ($p<0,01$) zwischen der Mitochondrien- und Plasmamembranfraktion besteht nur bei U. pugilator und C. maenas. Festzuhalten ist, daß vorallem in Fraktion M die (Na^+,K^+)-ATPase ohne Detergensbehandlung unterbestimmt wird.

Alle weiteren Untersuchungen der (Na^+,K^+)-ATPase wurden mit dem aktivierten Enzym durchgeführt, um Fehlbestimmungen zu vermeiden. Detailierte Darstellungen der Differentialzentrifugation folgen (4.2.1), allerdings sind diese Ergebnisse nur aufgrund der Voruntersuchungen zur SDS-Aktivierung dieses Abschnittes möglich geworden.

4.1.4 Die Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase in Abhängigkeit vom Außenmedium

Die Anpassung der untersuchten Kurzschwanzkrebse an geringeren Salzgehalt ruft eine Erhöhung der (Na^+,K^+)-ATPase – Aktivität hervor (siehe 1.2.1). Um festzustellen, ob auch durch die Messung des SDS-aktivierten Enzyms diese physiologische Antwort zu finden ist, wurden Adaptationsversuche mit drei euryhalinen Crustaceenarten durchgeführt.

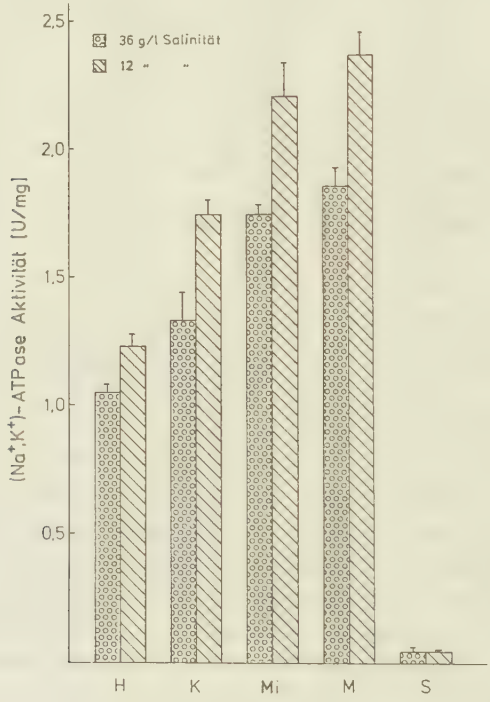


Abb. 8: Einfluß der Adaptation von U. pugilator an verdünnten Salzgehalt auf die (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität, posteriore Kiemen, Fraktionen der Differentialzentrifugation siehe 3.5.1, $\bar{x} \pm s_m$ n = 6.

Am Beispiel von U. pugilator ist in Abb. 8 die Erhöhung der (Na^+,K^+)-ATPase – Aktivität durch Anpassung von 36 g/l auf 12 g/l Salzgehalt in allen Fraktionen der Differentialzenrtifugation zu erkennen. Signifikanzen bestehen jedoch nur im Roh-

homogenat ($p<0,05$), in Fraktion Mi ($p<0.05$) und in Fraktion M ($p<0.01$).

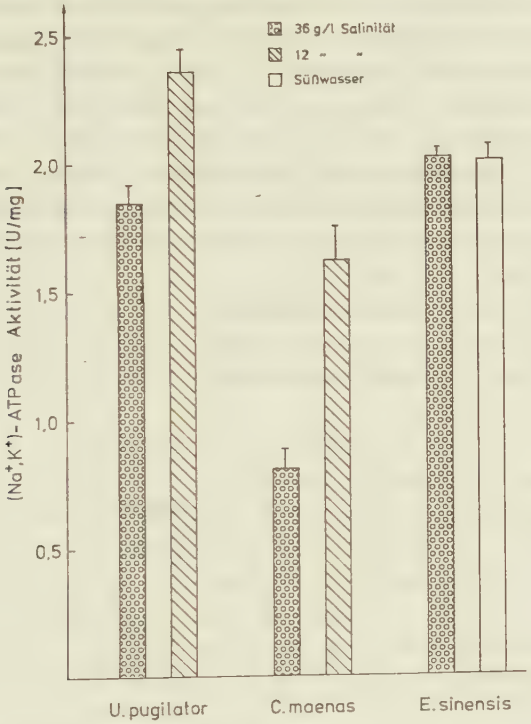


Abb. 9: Einfluß der Adaptation an verschiedene Salzgehalte einiger Krabben auf die (Na^+,K^+)-ATPase Aktivität, posteriore Kiemen, Fraktion M, $\bar{x} \pm s_m$ n = 3-6.

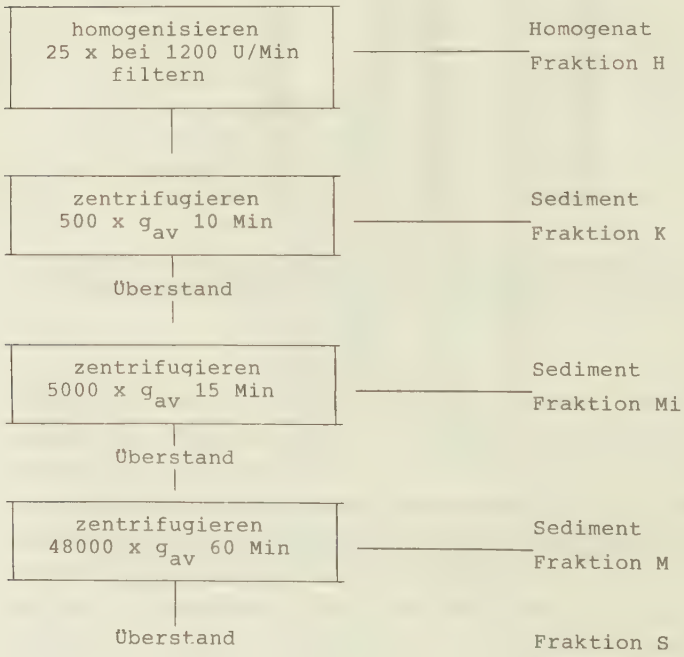
Eine signifikant erhöhte (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität ($p<0.01$) konnte nur bei U. pugilator und C. maenas festgestellt werden (Abb. 9). Diese Tiere wurden von 36 g/l auf 12 g/l Salinität angepaßt. Die chinesische Wollhandkrabbe wurde normalerweise in Süßwasser gehalten, aus diesem Grund erfolgte die Anpassung an 36 g/l. Hier konnte selbst nach 14 Tagen Adaptationszeit keine Erniedrigung der (Na^+,K^+)-ATPase - Aktivität gefunden werden.

4.2 Isolierung der Zellmembranen

Die Charakterisierung von Transportmechanismen in den Zellmembranen Epithelzellen muß an möglichst reinen und nativen Membranvesikeln durchgeführt werden. Im folgenden werden einige Methoden vorgestellt, die zur Isolierung solcher Membranpartikel führen können (siehe 1.4.1), dargestellt. Für die Experimente zur Isolierung der Zellmembranen wurden nur posteriore Kiemen der Wollhandkrabbe E. sinensis verwendet. Die Tiere waren mindestens 4 Wochen an Süßwasser adaptiert.

4.2.1 Differentielle Zentrifugation

Flußdiagramm der Differentialzentrifugation :



Im Zuge der differentiellen Zentrifugation können Zellmembranvesikel angereichert werden. Insbesondere das Markerenzym für die basolaterale Zellmembran der Kiemenepithelzellen (Na^+,K^+)-ATPase zeigt mit dem Faktor 3.4 eine deutliche Anreicherung gegenüber dem Rohhomogenat (H) in Fraktion M. Eine hohe Ausbeute von 65 % der eingesetzten Aktivität konnte ebenfalls in dieser Fraktion erreicht werden. Die Enzyme Leucin-Arylamidase (LAP) und Nukleosid-Diphosphatase (NDPase), die in verschiedenen Geweben in der apikalen Zellmembran nachgewiesen werden können (Sabolić & Burckhardt 1983a, Hays & Barland 1966, Scott et al. 1983), wurden in der bei 48000 x g_{av} sedimentierenden Fraktion M mit den Faktoren von 1.7 bzw. 1.8 geringer angereichert. Höhere Anreicherungen sind jedoch in keiner der anderen Fraktionen festzustellen (siehe Tab.: 1).

Die bei 5000 x g sedimentierende Mitochondrienfraktion (Mi) zeichnet sich durch die höchste gefundene Anreicherung der Succinat Dehydrogenase (SDH) von 3.5 aus. Die größte Ausbeute von 40 % ist allerdings in Fraktion M zu finden. Dieser Nachteil, der auf die verhältnismäßig geringe g-Zahl zur Erlangung von Fraktion Mi zurückzuführen ist, wurde bewußt in Kauf genommen, um die Ausbeuten der Zellmembranen in Fraktion M möglichst hoch zu halten.

Die Ausbeute der untersuchten Enzyme aller Fraktionen zusammengenommen lagen mit 89 % für die (Na^+,K^+)-ATPase, 88 % für die SDH, 80 % für die LAP und 98 % für die NDPase nahe bei der des Proteins mit 95 %.

In Tabelle 1 sind detailiert die Daten für die Gesamtaktivität (G), die Ausbeute (%), die spezifische Aktivität (S.A.) und die Anreicherung (A) der Markerenzyme in den Fraktionen der Diffrentialzentrifugation von Präparationen aus posterioren Kiemen von *E. sinensis* dargestellt.

		Protein		(Na^+,K^+)-ATPase				SDH			
		G	%	G	%	S.A.	A	G	%	S.A.	A
H	$\bar{x}$	160.7	100	136.2	100	0.857	1.0	9090	100	56.2	1.0
	s_m	8.1		6.4		0.059		793		3.5	
K	$\bar{x}$	9.9	6.2	8.6	6.3	0.857	1.0	1144	12.9	115.0	2.1
	s_m	0.6	0.2	1.0	0.6	0.080		78	1.2	5.0	
Mi	$\bar{x}$	13.5	8.5	5.5	4.0	0.384	0.5	2608	29.4	195.0	3.5
	s_m	0.8	0.7	1.9	1.4	0.111		128	2.6	11.7	
M	$\bar{x}$	30.5	19.0	88.3	65.0	2.936	3.4	3690	40.0	119.0	2.1
	s_m	2.5	1.3	6.1	3.9	0.185		450	2.3	6.8	
S	$\bar{x}$	100.0	62.0	18.7	11.9	0.182	0.2	548	6.0	5.6	0.1
	s_m	7.3	1.7	3.6	3.8	0.023		49	0.3	0.2	
Rec	$\bar{x}$	153.7	95.7	121.0	89.2			7990	88.5		
	s_m	8.9	1.3	8.8	6.0			585	1.8		

		LAP				NDPase			
		G	%	S.A.	A	G	%	S.A.	A
H	$\bar{x}$	2198	100	14.0	1.0	1292	100	8.0	1.0
	s_m	255		3.5		166		2.1	
K	$\bar{x}$	130	7.5	16.6	1.2	131	10.2	13.3	1.7
	s_m	36	1.1	2.2		26	1.4	2.7	
Mi	$\bar{x}$	111	5.0	8.2	0.8	87	6.9	6.2	0.8
	s_m	17	0.5	0.9		22	2.1	1.3	
M	$\bar{x}$	683	31.2	24.0	1.7	439	35.7	14.7	1.8
	s_m	77	1.3	5.6		50	4.5	1.8	
S	$\bar{x}$	807	36.8	8.0	0.6	578	46.1	5.9	0.7
	s_m	116	4.2	1.3		70	5.0	0.9	
Rec	$\bar{x}$	1764	80.6			1239	98.7		
	s_m	186	2.8			131	9.9		

Tab. 1: Differentialzentrifugation, Verteilung der Markerenzyme in den einzelnen Fraktionen Gesamtaktivität (G), prozentuale Verteilung (%), spezifische Aktivität (S.A.), Anreicherung (A), Ausbeute (Rec), alle Angaben als Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardfehler (s_m) n=5, SDH, LAP, NDPase Aktivitäten in mU/mg, (Na^+,K^+)-ATPase in U/mg, Protein in mg.

4.2.2 Reinigung der groben Membranfraktion

Die grobe Membranfraktion M aus der Differentialzentrifugation ist trotz des hohen Gehaltes an Zellmembranvesikeln noch stark mit mitochondrialen Membranen kontaminiert. Aufgrund dessen ist es notwendig weitere Reinigungsschritte anzuschließen. Zusätzlich soll untersucht werden, ob die apikalen von den basolateralen Zellmembranen aufgrund ihrer unterschiedlichen Schwebedichte getrennt werden können. Im Folgenden werden zwei Methoden der Dichtegradientenzentrifugation dargestellt.

4.2.2.1 Selbstorientierender Percoll-Gradient

Mit Percoll ist es möglich besonders flach ansteigende, selbstorientierende Dichtegradienten herzustellen. Der Dichtebereich zwischen 1.035 g/ml und 1.070 g/ml läßt sich sehr stark spreizen. Es wurden Versuche mit Ausgangskonzentrationen des Percolls von 8, 10, 12, 14, 16 und 18 % (v/v) durchgeführt.

Am Beispiel eines 12 % Percoll-Gradienten ist in Abb.: 10 die Verteilung der Markerenzyme dargestellt. Zwei deutliche Banden sind zu erkennen, eine im Dichtebereich um 1.035 g/ml (später Fraktion G I) sowie eine zweite zwischen 1.049 und 1.069 g/ml (Fraktion G II). Diese Banden werden auch im Proteinprofil deutlich. Die Markerenzyme der Zellmembranen, (Na^+,K^+)-ATPase, LAP und NDPase sind in der Bande geringerer Dichte (G I) gemeinsam zu finden, während sie in G II wesentlich weniger enthalten sind. Eine Trennung der (Na^+,K^+)-ATPase von der LAP und NDPase ist nicht festzustellen. Die mitochondrialen Membranen sammeln sich insbesondere in G II an, wenngleich auch noch größere Anteile im Bereich der Zellmembranen enthalten sind. Ähnliche Ergebnisse sind mit anderen Ausgangskonzentrationen des Percolls zu erreichen, mit dem Unterschied, daß Fraktion G I bei sehr niedrigen Percoll-Konzentrationen diffus auseinandergezogen wird, ohne daß die Zellmembranenzyme voneinander getrennt werden.

Festzuhalten bleibt, daß Percoll-Gradienten nicht geeignet sind apikale und basolaterale Zellmembranbereiche der Epithelzellen der Kiemen zu trennen. Außerdem sind die Anreicherungen in G I der (Na^+,K^+)-ATPase mit 1.3-fach, der LAP mit 1.8-fach und der NDPase mit 1.4-fach über der verwendeten Fraktion M aus der Differentialzentrifugation unbefriedigend. Ursache dafür ist wahrscheinlich die bleibende mitochondriale Kontamination.

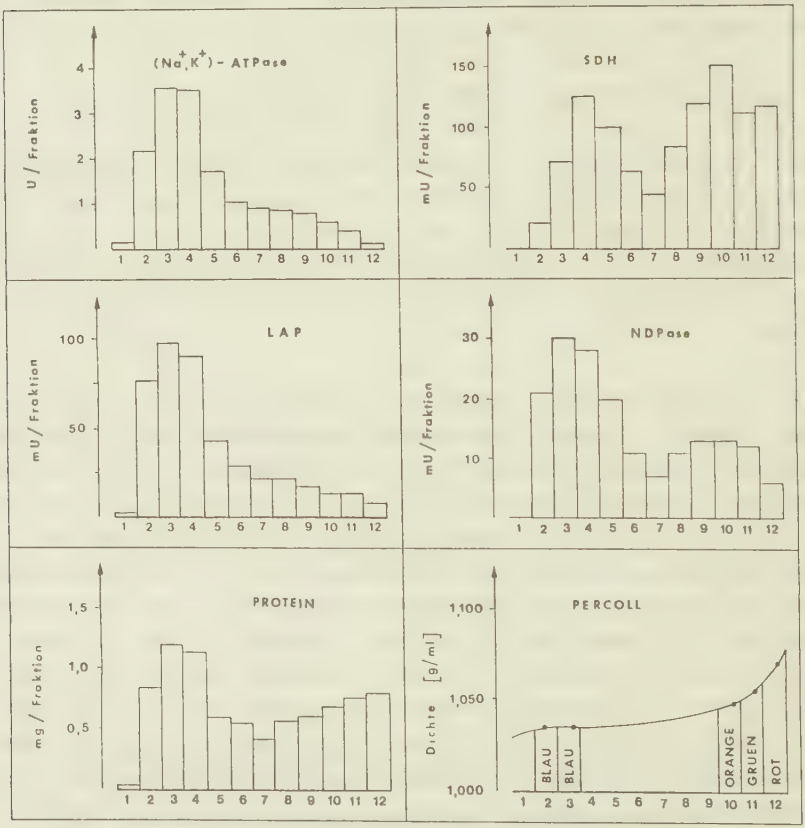


Abb. 10: Verteilung der Markerenzyme im Percoll-Gradient, Aktivitätsangaben als Gesamtwerte pro Fraktion (3 ml), Farben stehen für die "Density Marker Beads" blau = 1.035 g/ml, orange = 1.049 g/ml, grün = 1.056 g/ml, rot = 1.069 g/ml, x aus Doppelbestimmungen einer Präparation.

4.2.2.2 Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll

Ficoll 400 ist ein weiteres Material, mit dem in ihrer Dichte flach ansteigende Gradienten hergestellt werden können. Zur Untersuchung, ob mit Ficoll bessere Ergebnisse erzielt werden können, wurde Fraktion M auf einem kontinuierlichen Ficoll-Gradienten mit einem Dichtebereich von 1.052 - 1.084 g/ml zentrifugiert (Abb.:11).

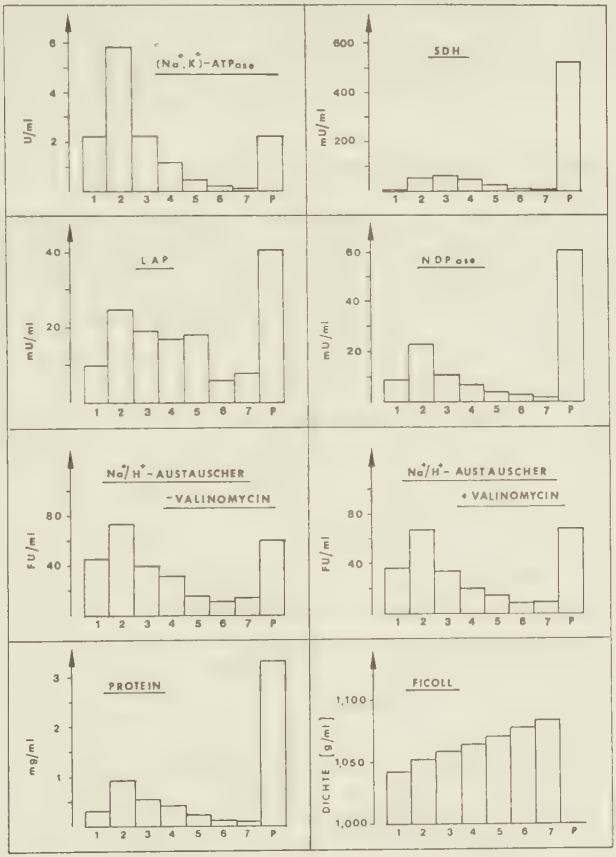


Abb. 11: Aktivitäten des Na^+/H^+-Austauschers und der Marker Enzyme im kontinuierlichen Ficollgradienten, alle Aktivitätsangaben pro ml Gradientenmaterial, Volumina der Fraktionen 1-7 = 3 ml, P (Sediment) = 1 ml, $\bar{x}$ aus Doppelbestimmungen einer Präparation.

Die (Na^+,K^+)-ATPase enthaltenden Membranen sedimentieren zum größten Teil bei der Dichte von 1.052 g/l. Die LAP und NDPase unterscheiden sich nur geringfügig vom Verhalten der (Na^+,K^+)-ATPase, indem sie etwas mehr bis zur Dichte von 1.070 g/ml und im Sediment wiederzufinden sind. Gleiches gilt für die Aktivität des Na^+/H^+-Austauschers. Die (Na^+,K^+)-ATPase wird auch in diesem Gradienten nicht von der LAP und NDPase getrennt. Mitochondriale Membranen, charakteresiert durch die SDH, werden jedoch deutlich von den Zellmembranen abgetrennt, sodaß die Anreicherungen der Markerenzyme der Zellmembranen deutlich höher sind als im Percoll-Gradienten (siehe Tabelle 2).

4.2.2.2.1 Ficoll-Stufengradient

Für die präparative Reinigung der Zellmembranen wurde aufgrund der Ergebnisse des koninuierlichen Ficoll-Gradienten ein Stufengradient aus 5 % und 15 % Ficoll gewählt.

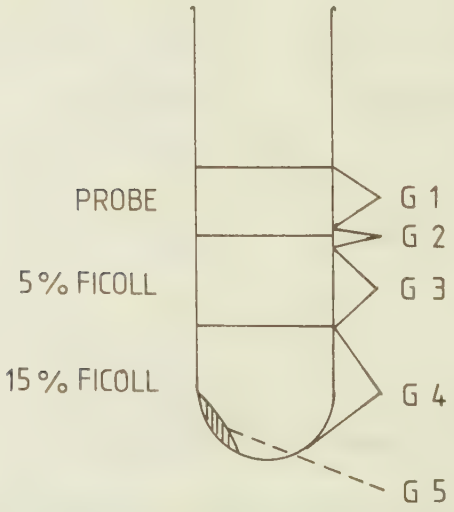


Abb. 12: Schema der Zentrifugation im Ficoll-Stufengradienten, links die Ficoll-Konzentrationen, rechts die Bezeichnungen der Fraktion.

In diesem Gradient findet sich die (Na^+,K^+)-ATPase mit einer über 9-fachen Anreicherung über dem Homogenat in Fraktion G 2 an der Phasengrenze zum 5 % Ficoll wieder (Tab.: 2). Auch die Anreicherung der LAP ist hier mit 5.5 am höchsten. Fraktion G 3 (5 % Ficoll + Bande an der Phasengrenze zum 15 % Ficoll) enthält jedoch die größten Anteile aller Markerenzyme der Zellmembranen, zwischen 26 und 43 % der eingesetzten Fraktion M. Vergleicht man die spezifischen Aktivitäten der Fraktionen G 2 und G 3, so läßt sich ein signifikanter Unterschied für die (Na^+,K^+)-ATPase ($p<0.05$), nicht aber für die LAP und NDPase feststellen.

Der Na^+/H^+-Austauscher ist in den Fraktionen, in denen die Zellmembranen angereichert vorliegen, mit den höchsten spezifischen Aktivitäten zu finden. Die in Tabelle 2 angegebenen Werte entsprechen den Signalen des elektroneutralen Na^+/H^+ Austausches unter Einsatz von Valinomycin. Ohne Valinomycin sind die Werte im Mittel in den Fraktionen G 2 und G 3 um 10 %, in G 4 bei 30 % und in G 5 um 23 % höher. Die Ausbeute konnte für den Na^+/H^+-Austauscher nicht berechnet werden, da eine Bestimmung der Aktivität im Rohhomogenat bzw. in der Fraktion M nicht möglich war.

Ficoll-Stufengradient

		Protein		(Na^+,K^+)-ATPase				SDH			
		G	%	G	%	S.A.	A	G	%	S.A.	A
M		23.9	100	74.9	100	2.936	3.4	3110	100	119.0	2.1
G 1	$\bar{x}$	2.1	8.1	1.5	1.9	0.655	0.8	24	0.8	11.6	0.2
	s_m	0.3	2.3	0.8	1.0	0.301		4	0.1	1.4	
G 2	$\bar{x}$	1.0	4.1	8.3	11.0	7.922	9.2	39	1.3	37.4	0.7
	s_m	0.2	0.5	1.3	1.2	0.415		7	0.2	2.9	
G 3	$\bar{x}$	4.4	17.3	28.2	37.8	6.465	7.5	446	15.0	102.6	1.8
	s_m	0.3	1.3	2.5	1.7	0.416		41	1.5	6.5	
G 4	$\bar{x}$	1.0	3.8	2.5	3.3	2.711	3.2	155	4.9	154.4	2.7
	s_m	0.1	0.3	0.3	0.3	0.410		31	0.6	16.0	
G 5	$\bar{x}$	5.2	19.8	3.1	4.1	0.656	0.8	1470	46.6	280.0	5.0
	s_m	1.2	3.7	0.3	0.2	0.078		390	9.5	25.1	
Rec	$\bar{x}$	13.6	53.1	43.5	58.1			2144	68.6		
	s_m	1.5	4.2	4.1	2.0			415	8.8		

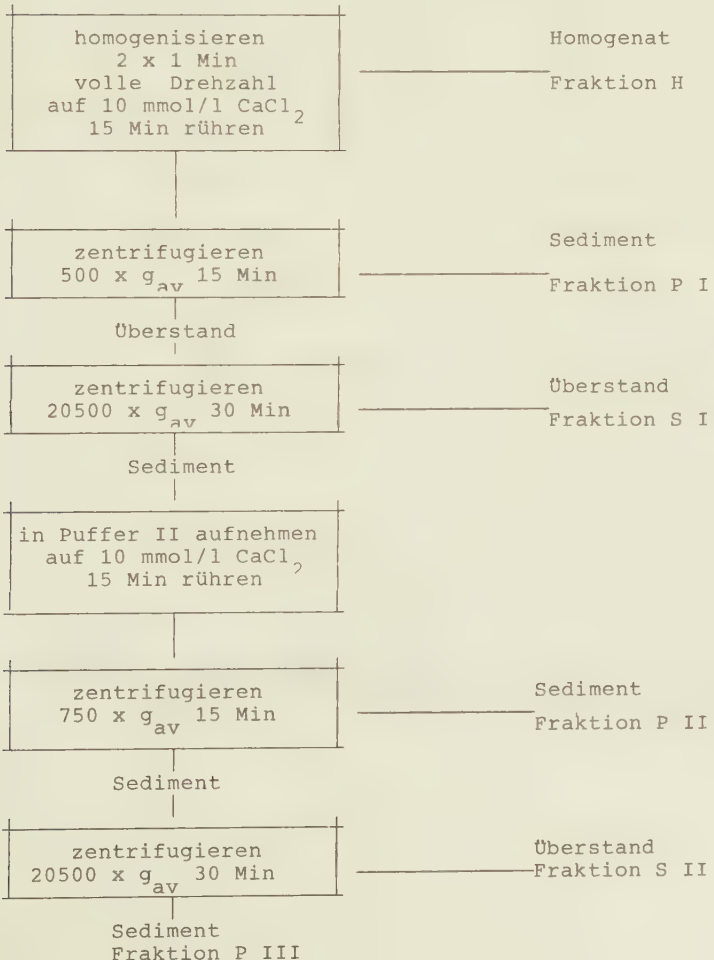
		LAP				NDPase				Na^+/H^+-At
		G	%	S.A.	A	G	%	S.A.	A	S.A.
M		616	100	24.0	1.7	345	100	14.7	1.8	
G 1	$\bar{x}$	36	6.4	20.4	1.5	20	7.0	11.2	1.4	---
	s_m	5	0.8	5.6		24	2.2	4.7		
G 2	$\bar{x}$	66	10.5	77.4	5.5	24	6.7	22.7	2.8	160.4
	s_m	24	2.8	33.1		6	2.0	6.6		27.9
G 3	$\bar{x}$	276	43.5	67.6	4.8	95	26.2	22.1	2.8	152.9
	s_m	117	13.2	32.5		7	1.9	2.0		26.5
G 4	$\bar{x}$	42	7.0	50.0	3.6	19	5.4	21.1	2.6	113.7
	s_m	11	1.2	16.8		1	0.4	2.5		32.3
G 5	$\bar{x}$	76	13.1	16.4	1.2	63	17.9	14.4	1.8	80.5
	s_m	20	3.4	6.1		3	2.1	2.3		33.0
Rec	$\bar{x}$	495	80.5			226	64.0			
	s_m	157	14.8			17	7.9			

Tab. 2: Verteilung der Markerenzyme in den einzelnen Fraktionen des Ficoll-Stufengradienten, M = aufgetragene grobe Membranfraktion der Differentialzentrifugation, Bezeichnungen der Fraktionen siehe Abb. 12, Aktivität des Na^+/H^+-Austauschers in FU/mg, alle weiteren Angaben siehe Tab.: 1.

4.2.3 Differentielle Kalziumfällung

Apikale Zellmembranvesikel aus einigen transportierenden Epithelien können mit Hilfe der differentiellen Kalziumfällung spezifisch von anderen im Homogenat vorliegenden Membranpartikeln getrennt werden (siehe 1.4.1). Da die Dichtegradientenzentrifugationen in diesem Punkt nicht zum erwünschten Erfolg führen, ist überprüft worden, ob dieses Verhalten auch auf die Zellmembranen des Krabbenkiemenepithels zutrifft.

Flußdiagramm der differentiellen Kalziumfällung :



Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß sich die Markerenzyme der Zellmembranen sehr ähnlich verteilen. Nach der 1. Fällung (P I) ist die Wirkung auf die basolateralen und mitochondrialen Membranen zwar am stärksten, d.h die größten Anteile dieser Membranen befinden sich im Niederschlag. Gleichwohl ist die (Na^+,K^+)-ATPase mit dem Faktor 3.4 nach den Fällungen in Fraktion P III immer noch deutlich angereichert. Hingegen ist kaum eine Anreicherung der LAP und NDPase zu erreichen.

	Protein		(Na+,K+)-ATPase				SDH			
	G	%	G	%	S.A.	A	G	%	S.A.	A
H	146.7	100	22.7	100	0.155	1.0	5616	100	38	1.0
P I	23.9	16.3	16.8	74.0	0.704	4.5	3072	54.7	129	3.4
P II	2.7	1.8	1.4	6.2	0.520	3.4	506	9.0	189	5.0
P III	2.8	1.9	1.5	6.6	0.524	3.4	96	1.7	33	0.9
S I+II	109.1	74.4	1.7	7.3	0.015	0.1	1352	24.1	12	0.3
Rec	138.5	94.4	21.4	94.1			5026	89.5		

	LAP				NDPase			
	G	%	S.A.	A	G	%	S.A.	A
H	5000	100	34.1	1.0	1674	100	11.4	1.0
P I	1800	36.0	75.3	2.2	588	35.0	24.6	2.3
P II	203	4.1	76.0	2.2	88	5.3	33.0	3.0
P III	173	3.5	60.9	1.8	42	2.5	14.8	1.3
S I+II	891	17.8	8.2	0.2	1144	68.0	10.5	0.9
Rec	3067	61.3			1862	111.2		

Tab. 3: Verteilung der Markerenzyme in den einzelnen Fraktionen der differentiellen Ca-Fällung, Bezeichnungen der Fraktionen siehe Flußdiagramm, $\bar{x}$ aus Doppelbestimmungen einer Präparation, alle weiteren Angaben wie Tabelle 1.

Für die nun folgenden Untersuchungen zur Charakterisierung der (Na^+,K^+)-ATPase und des Na^+/H^+-Austauschers sind die Zellmembranfraktionen des Ficoll-Stufengradienten verwendet worden. Diese Methode wurde von den drei vorgestellten bevorzugt, weil hiermit die höchsten Anreicherungen der Markerenzyme aus den Zellmembranen erreicht werden, und zusätzlich die deutlichste Abtrennung von den mitochondrialen Membranen möglich ist.

4.3 Charakterisierung der (Na^+,K^+)-ATPase

Die (Na^+,K^+)-ATPase ist maßgeblich an den Ionentransportprozessen in den posterioren Kiemen der Kurzschwanzkrebse beteiligt. Zur Charakterisierung ihrer kinetischen Eigenschaften wurden 3 unabhängig voneinander gewonnene Fraktionen (G 3) aus Ficoll-Stufengradienten der posterioren Kiemen von E. sinensis mit einer spezifischen Aktivität von $\bar{x}$ 4.64 U/mg und einem Anreicherungsfaktor von 7.0 verwendet.

4.3.1 Proteinabhängigkeit des (Na^+,K^+)-ATPase-Tests

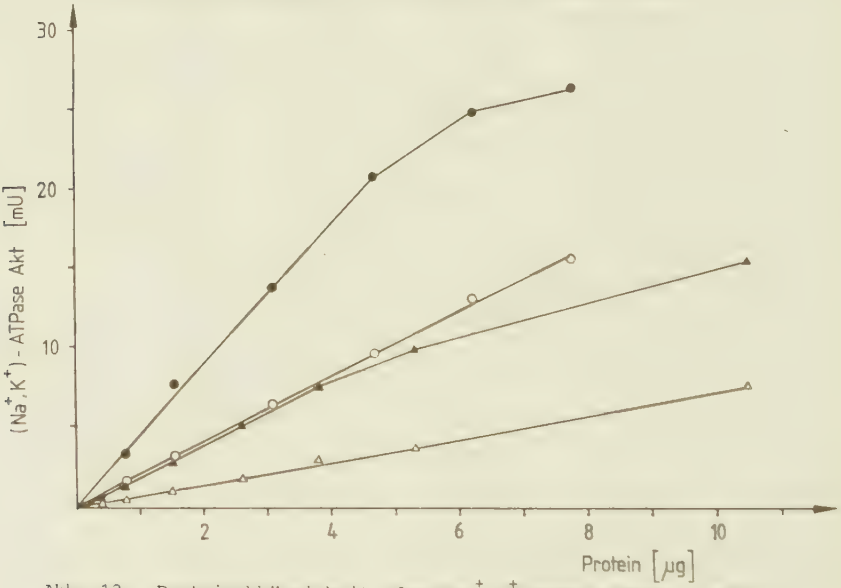


Abb. 13: Proteinabhängigkeit des (Na^+,K^+)-ATPase-Tests, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen einer Aufarbeitung, △ nichtaktivierte Fraktion M, ▲ M aktiviert, ○ G 3 nichtaktiviert, ● G 3 aktiviert, Testbedingungen siehe 3.7.1 und 3.8.

Wurden SDS-aktivierte Proben in den (Na^+,K^+)-ATPase-Test eingesetzt, ist ein lineares Verhältnis von Aktivität zu Membranprotein bis ca. 5 µg festzustellen und zwar unabhängig davon, ob die grobe Fraktion M oder die reinere Fraktion G 3 zur Bestimmung herangezogen wurde (Abb. 13). Nicht aktivierte Proben zeigen einen linearen Verlauf bis 20 µg Proteineinsatz (nicht dargestellt).

4.3.2 pH-Abhängigkeit

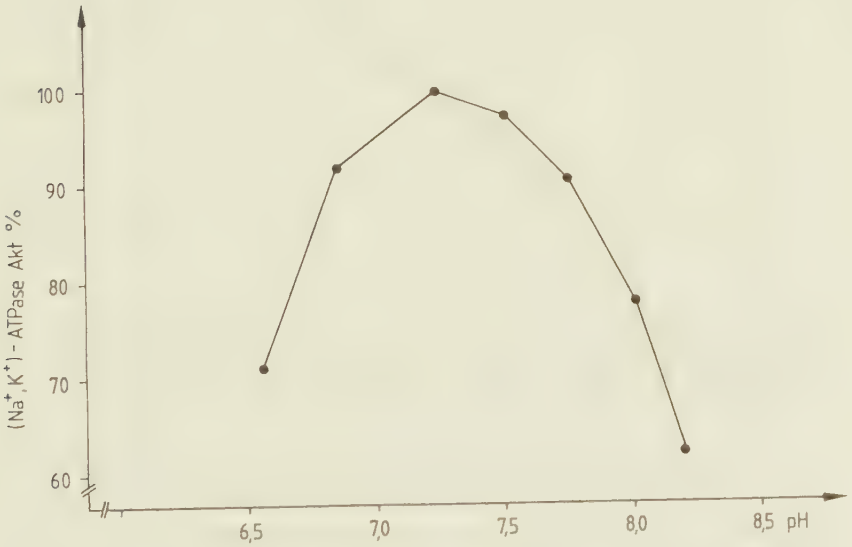


Abb. 14: pH-Abhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen einer Fraktion G 3 in Prozent der maximalen Aktivität, Testbedingungen : Messung durch P_i-Freisetzung, sonst siehe 3.7.1.

Die (Na^+,K^+)-ATPase zeigt eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit im Bereich von 6.5 bis 8.0 (Abb. 14). Das Optimum liegt um pH 7.2.

4.3.3 Temperaturabhängigkeit

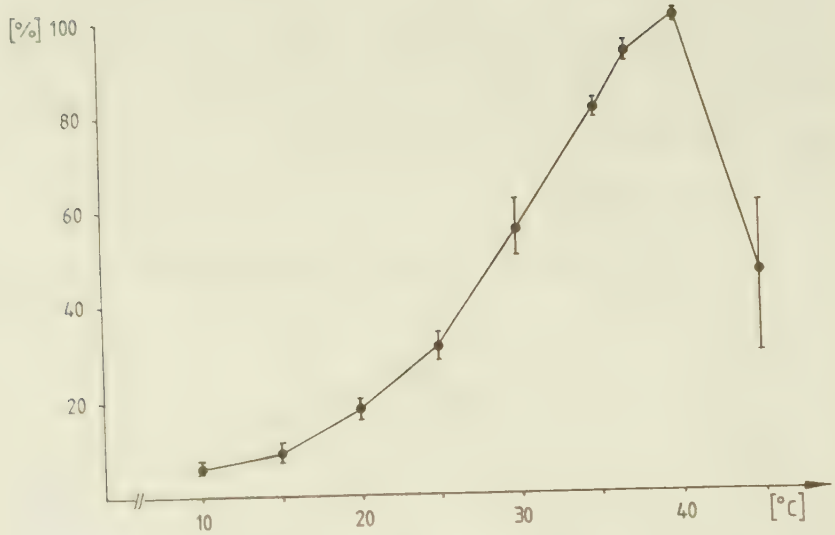


Abb. 15: Temperaturabhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase, in % der maximalen Aktivität, $\bar{x} \pm s_m$ n = 3 aus unabhängig gewonnenen Fraktionen G 3, Messung unter ^mP_i-Freisetzung siehe 3.7.1.

Die Temperaturkurve der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität hat ihr Optimum bei 40°C (Abb. 15). Der Temperaturkoeffizient Q_{10} ist gleich dem Faktor, um den sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei Temteraturerhöhung um 10°C erhöht. Er beträgt zwischen 15 und 25°C 3.4 und zwischen 25 und 35°C 2.6.

Die (Na^+,K^+)-ATPase ist als membrangebundenes Enzym vom Zustand der sie umgebenden Lipide abhängig. Temperaturabhängige Phasenübergänge dieser Lipide vom flüssig-kristallinen zum flüssigen Zustand wirken sich auf die Enzymaktivität aus (Kimelberg & Papahadjopoulos 1974). Arrhenius-Plots der Temperaturabhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität können diese Lipidzustände deutlich machen.

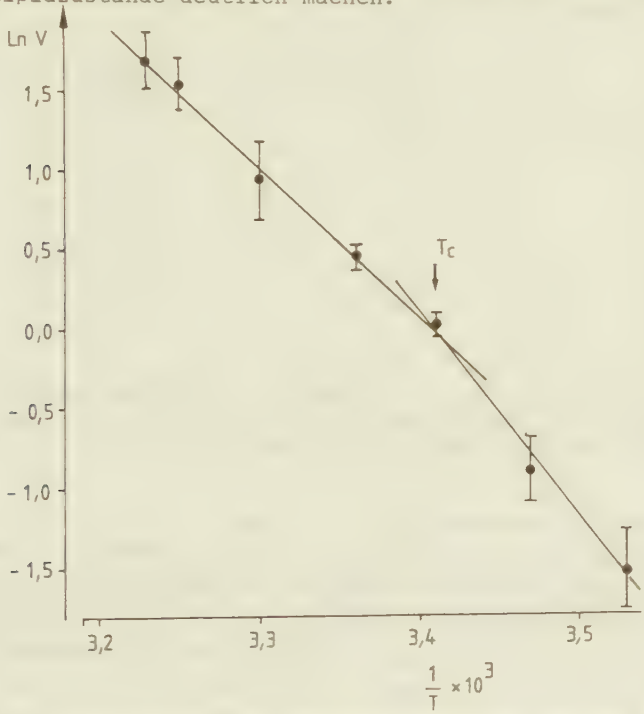


Abb. 16: Arrhenius-Plot der Temperaturabhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität, v in U/mg, T in K.

Werden die erhaltenen Aktivitäten mit Hilfe der Arrhenius-Auftragung dargestellt (Abb. 16), ergibt sich eine Kurve. Durch die Berechnung von Regressionsgeraden lassen sich 2 Tangenten an die Kurve annähern, die sich in T_c = 20.4°C, der sogenannten Knickpunkttemperatur, schneiden. Aus der Steigung der Geraden läßt sich die jeweilige Aktivierungsenergie oberhalb 18.6 Kcal/mol bzw. unterhalb 25.6 Kcal/mol von T_c berechnen (Dixon & Webb 1979).

4.3.4 Ouabainhemmung der (Na^+,K^+)-ATPase

Die (Na^+,K^+)-ATPase wird spezifisch durch das Herzglykosid Ouabain (g-Strophantin) gehemmt. Inwieweit die in der Fraktion G 3 vorhandene ATPase-Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase zuzurechnen ist zeigt Tabelle 4.

Na^+	K^+	Ouabain	% max. Akt.
100	20	0	100
100	20	5	20.8 ± 1.9
100	0	0	23.6 ± 1.4
100	0	5	17.6 ± 2.0
0	20	0	11.8 ± 1.3
0	20	5	13.0 ± 1.5
0	0	0	10.3 ± 0.7
0	0	5	10.6 ± 0.8

Tab. 4: Einfluß von Na^+, K^+ und Ouabain auf die ATPase-Aktivität in Fraktion G 3 in % der maximalen Aktivität, Konzentrationen in mmol/l, sonstige Testbedingungen siehe 3.7.1, $x \pm s_m$ n = 3.

Die Gesamt-ATPase – Aktivität ist durch 5 mmol/l Ouabain in Anwesenheit von Na^+ und K^+ Ionen zu 80 % gehemmt. Im Na^+ - K^+ freien Ansatz werden allerdings weitere 10 % der Aktivität inhibiert. Darauß folgt, daß auch bei 5 mmol/l eingestztem Ouabain keine vollständige Hemmung der (Na^+,K^+)-ATPase zu erreichen ist. Auch die K^+ –freien Ansätze zeigen einen Aktivitätsanteil, der der (Na^+,K^+)-ATPase zu zurechnen ist. Nach Überprüfung der im Test eingesetzten Lösungen, ließ sich eine Kontamination der SDS Aktivierungsmedien mit K^+ feststellen, die höchstwahrscheinlich auf eine Verunreinigung des RSA zurückzuführen ist. In Na^+-freien Ansätzen zeigte Ouabain keine Wirkung, sodaß ein Anteil von 10 % der Gesamtaktivität nicht der (Na^+,K^+)-ATPase zu zuordnen ist (Grund-ATPase).

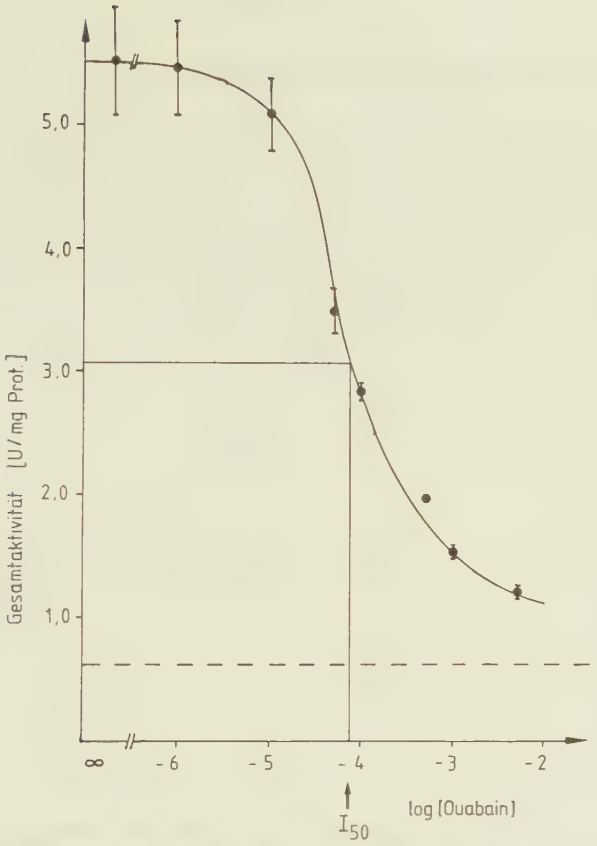


Abb. 17: Ouabainabhängigkeit der ATPasen aus Fraktion G 3, I_{50} = halbmaximale Aktivität des Na^+-abhängigen Anteils, gestrichelte Linie = Anteil der Na^+-unabhängigen ATPase, $\bar{x} \pm s_m$ n = 3, Messung unter P_i-Freisetzung siehe 3.7.1.

Abbildung 17 zeigt die Hemmwirkung verschiedener Ouabainkonzentrationen auf die ATPase-Aktivität. Der Kurvenverlauf deutet daraufhin, daß der (Na^+,K^+)-ATPase-Anteil bei 5 mmol/l noch nicht vollständig gehemmt ist. Die halbmaximale Hemmung der (Na^+,K^+)-ATPase ist bei 7.9×10^{-5} mol/l (pI_{50} 4.1) erreicht.

4.3.5 Substrat- und Aktivatorabhängigkeit

Die Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase hängt neben der Substratkonzentration (Mg-ATP-Komplex) von der Anwesenheit anderer Liganden ab. Na^+ und K^+ sind für ihre Aktivität unabdingbar, außerdem bestimmt das Konzentrationsverhältnis beider Ionen zueinander die Aktivität. Auch die freie Mg^{2+} Konzentration beeinflußt die (Na^+,K^+)-ATPase (siehe 1.3.1.1).

4.3.5.1 Mg-ATP-Abhängigkeit

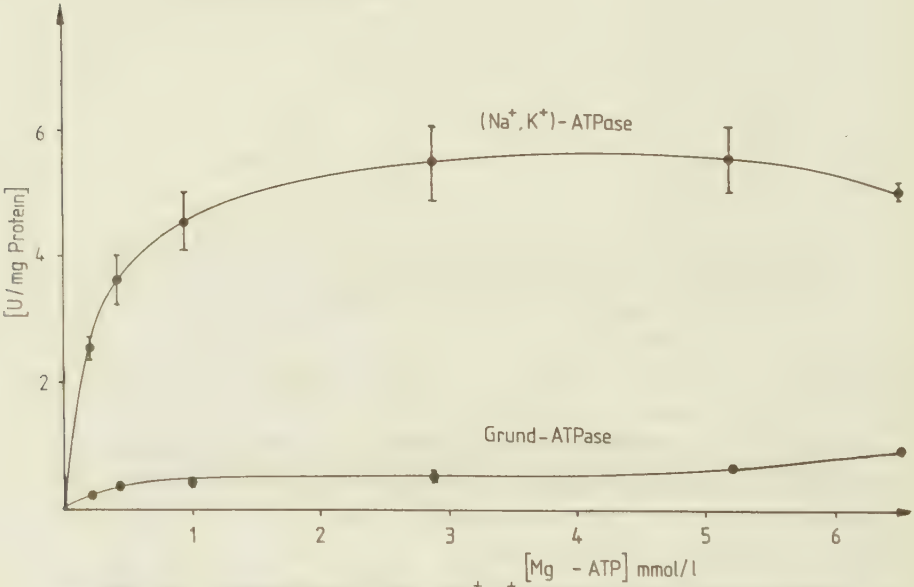


Abb. 18: Abhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase bzw. Grund-ATPase Aktivität von der Mg-ATP-Konzentration, $\bar{x} \pm s_m$ n = 3, Messung im ATP-regenerierenden System siehe 3.7.2.

Die (Na^+,K^+)-ATPase zeigt zum Substrat Mg-ATP eine einfache Michaelis-Menten Kinetik. Die maximale Aktivität wird zwischen 3 und 5 mmol/l Mg-ATP erreicht. Die freie ATP-Konzentration variierte bei diesen Versuchen zwischen 0.004 und 0.414 mmol/l. Freies Mg^{2+} variierte zwischen 3.4 und 9.8 mmol/l. Die Konzentrationsbereiche beider Liganden beeinflussen die Aktivität nur unwesentlich (siehe 5.3.3).

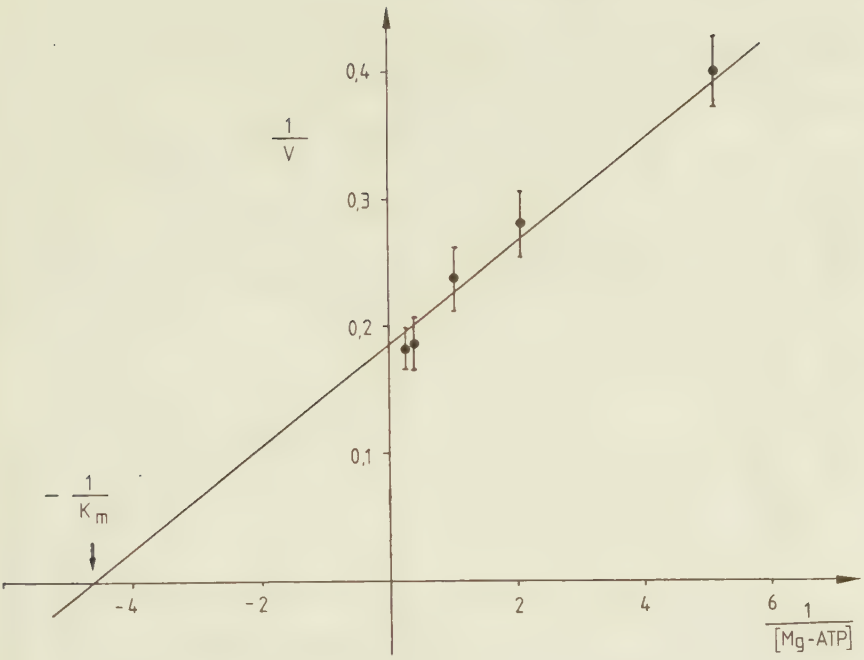


Abb. 19: Lineweaver-Burk-Plot der Daten aus Abb. 18, (Na^+,K^+)-ATPase.

Der Lineweaver-Burk-Plot aus den Daten der Abb. 18 ist linear, die Regressionsgerade hat den Korrelationskoeffizienten r = 0.992. Der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse entspricht dem reziproken Wert der maximalen Aktivität, V_{max} = 5.405 U/mg. Der Schnittpunkt mit der x-Achse entspricht dem negativen, reziproken Wert für die scheinbare K_m = 2.3×10^{-4} mol/l Mg-ATP (Abb. 19).

4.3.5.2 Mg^{2+}-Abhängigkeit

Mg^{2+} aktiviert die (Na^+,K^+)-ATPase (Abb.: 20).

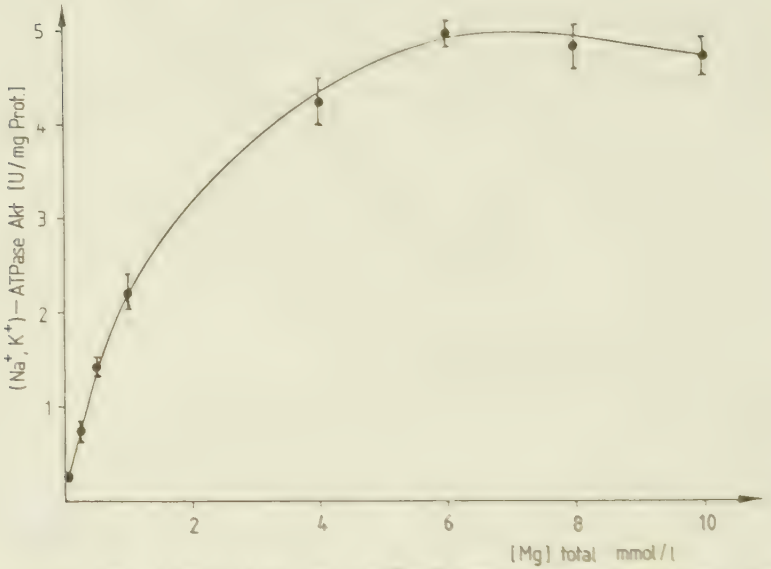


Abb. 20: Abhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität von der Mg-Konzentration, $\bar{x} \pm s_m$ n = 3, Messung unter P_i-Freisetzung.

Die maximale Aktivität ist bei 6 mmol/l Mg^{2+}-Konzentration erreicht, wenn 3 mmol/l ATP eingesetzt werden. Die Aktivität ist nahe 0, wenn kein Mg^{2+} vorhanden ist (Abb. 20). Es muß allerdings in Betracht gezogen werden, daß unter Mg^{2+}-freien Bedingungen auch kein Mg-ATP als Substrat zur Verfügung steht.

Da das gesamte Mg^{2+}_{total} sowohl frei (Mg^{2+}_{f}) als auch gebunden im Mg-ATP-Komplex vorliegt, kann über die tatsächliche Aktivierung durch eine Variation des Mg^{2+}_{t} wenig ausgesagt werden. Die frei vorliegende Mg-Konzentration kann durch die Formel

$$(MgATP) = \left(\frac{K + (ATP)_t + (Mg^{2+})_t}{2}\right) - \sqrt{\left(\frac{K + (ATP)_t + (Mg^{2+})_t}{2}\right)^2 - (ATP)_t \cdot (Mg^{2+})_t}$$

(K_{MgATP} = 0.215 mmol/l bei pH oberhalb 7.5)

berechnet werden, indem die Mg-ATP-Konzentration von der Mg^{2+}_{t}-Konzentration abgezogen wird (Wolf & Adolf 1969).

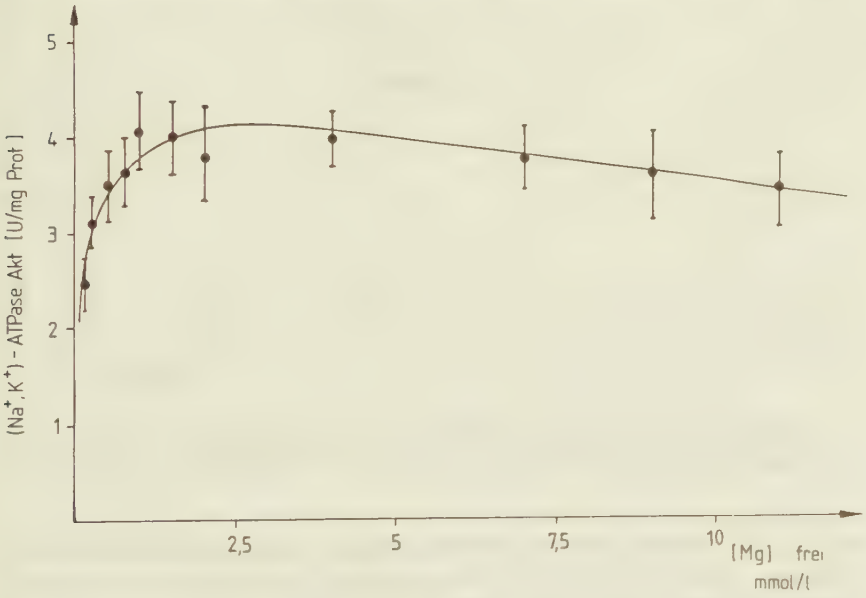


Abb. 21: Einfluß der freien Mg-Konzentration auf die (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität, $\bar{x} \pm s_m$ n = 3, Messung durch P_i-Freisetzung.

Abbildung 21 zeigt, daß die Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase auch vom freien Mg^{2+} moduliert wird. Die Mg-ATP-Konzentration war mit 3 mmol/l konstant, die ATP_f-Konzentration variierte zwischen 0.06 (0.25 mmol/l Mg_f) und 2.58 mmol/l (11 mmol/l Mg_f). Im Konzentrationsbereich 1 -11 mmol/l Mg^{2+}_{f} ist kein signifikanter Unterschied der Aktivitäten festzustellen, wäh-

rend bei gleicher ATP-Konzentration und 1 mmol/l eingesetztem Mg^{2+}_t erst 50 % der Aktivität erreicht ist (Abb. 20).

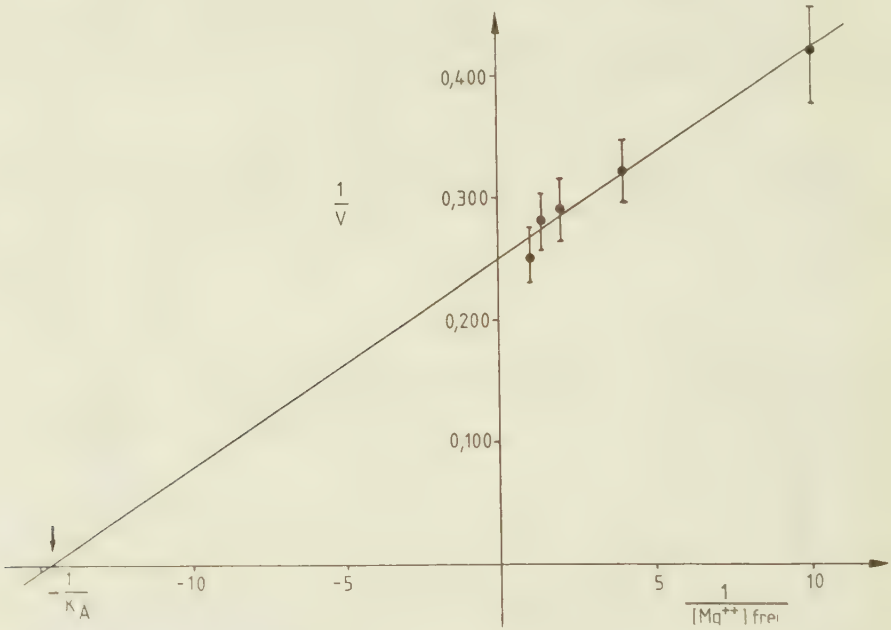


Abb. 22: Reziprokdarstellung der Daten aus Abb. 21 bis 1 mmol/l Mg_f

Wird eine doppelt reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit v gegen die Mg^{2+}_f-Konzentration gewählt, so erhält eine scheinbare Aktivatordissoziationskonstante $K_{a,app}$. Die Punkte der Abbildung 22 lassen sich an eine Regressionsgerade mit dem Korrelationskeoffizienten r = 0.989 annähern. Der negative, reziproke Wert des Schnittpunktes mit der x-Achse entspricht $K_{a,app} = 6.8 \times 10^{-5}$ mol/l.

4.3.5.3 Na^+-Abhängigkeit

Na^+ aktiviert die Ouabain-abhängige ATPase-Aktivität.

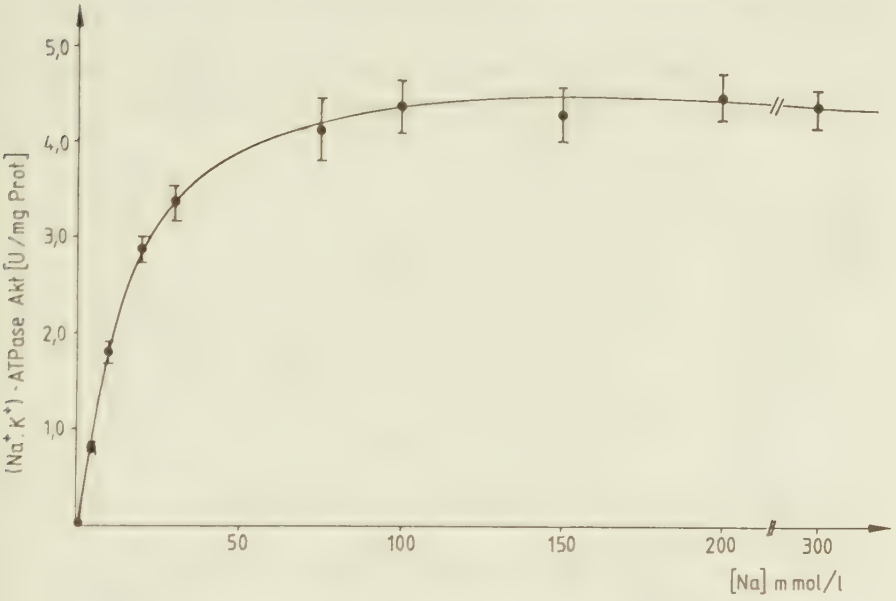


Abb. 23: Einfluß der Na^+-Konzentration auf die (Na^+,K^+)-ATPase Aktivität, Testbedingungen siehe 3.7.1 gegebenenfalls wurde Na durch Cholin ersetzt, $\bar{x} \pm s_m$ n = 3, 20 mmol/l K^+ im Test.

Unter Anwesenheit von 20 mmol/l K^+ ist die maximale (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität bei 100 mmol/l Na^+ erreicht. Selbst bei 300 mmol/l Na^+ ist keine Hemmung der Aktivität erkennbar. Unter Na^+-freien Bedingungen ist keine Aktivität mehr meßbar (Abb. 23).

Wird die Lineweaver-Burk-Auftragung (nicht dargestellt) für die Na^+-Anhängigkeit gewählt, zeigt sich eine leicht nach oben gebogene Kurve. Aufgrund dessen lassen sich die kinetischen Konstanten der Na^+-Aktivierung mit Hlife dieser Auftragung nicht ermitteln. Ursache dafür kann ein positiv-koopereativer Effekt von mehreren Na^+-Bindungsstellen auf die ATP-Hydrolyse

sein. Auftragungen von 1/v gegen $1/(Na^+)^2$ oder $1/(Na^+)^3$, wie sie für die Na^+-Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase vorgeschlagen werden (Peter & Wolf 1972), führen zu Graphen, die nach unten gebogen sind.

Eine weitere Möglichkeit, die kinetischen Parameter der Na^+-Aktivierung zu erhalten, ist die Hanes-Woolf-Auftragung.

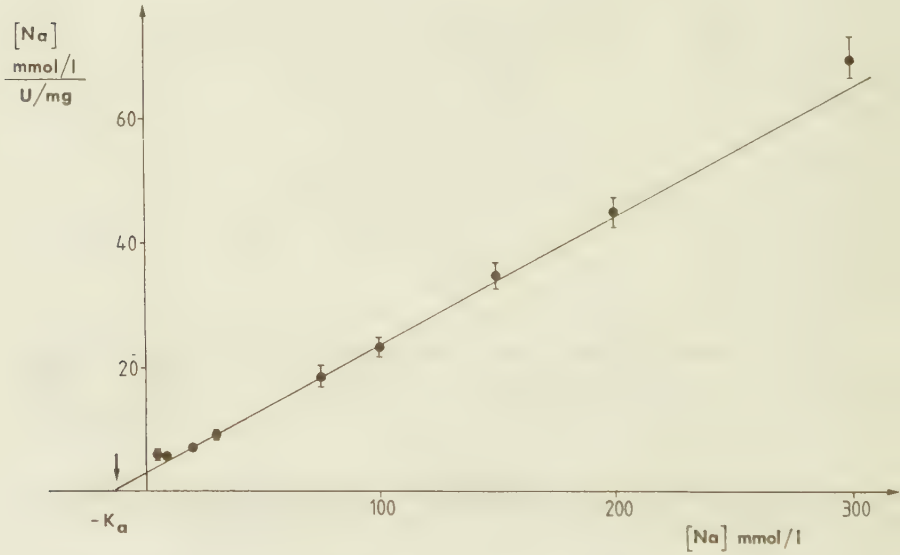


Abb. 24: Hanes-Woolf-Plot der Daten aus Abb. 23.

Auch im Hanes-Woolf-Plot läßt sich eine, wenn auch nur sehr geringe, Abweichung der Werte bei niedrigen Na^+-Konzentrationen von der Regressionsgeraden erkennen (Abb. 24). Die scheinbare K_a für Na^+ kann aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abzisse im Ordinatennullpunkt mit 13.9 mmol/l errechnet werden.

Kooperative Effekte von Aktivatoren können auch mit Hilfe der Hill-Auftragung untersucht werden.

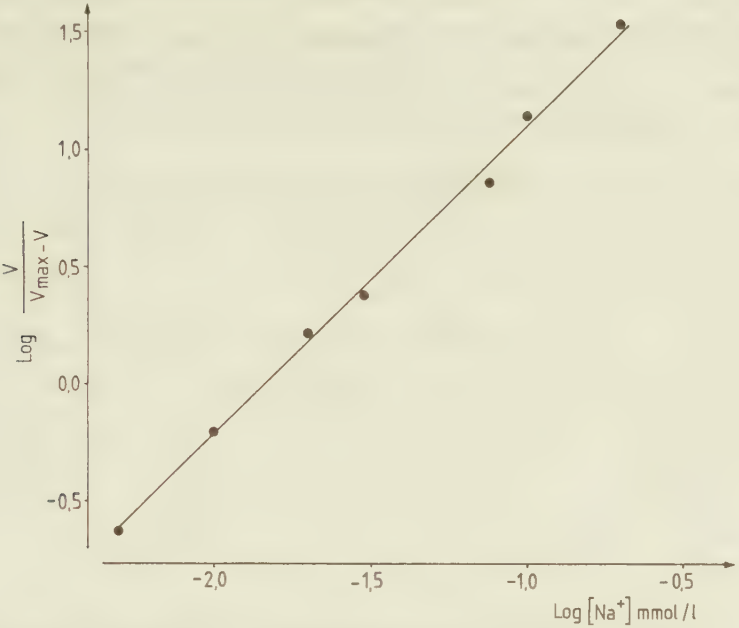


Abb. 25: Hill-Plot aus den Mittelwerten der Abb. 23, V_{max} aus Abb. 24.

Der Hill-Plot der Na^+-Abhängigkeit bis 200 mmol/l ist linear ($r = 0.998$) (Abb. 25). Der Hill-Koeffizient n_H ist gleich der Steigung der Regressionsgeraden. Er hat den Wert 1.34. Es liegt also eine leichte positive Kooperativität für Na^+. Auch aus dem Hill-Plot läßt sich die scheinbare Aktivatorbindungskonstante für Na^+ berechnen. Sie ist gleich dem Abzissenabschnitt der Geraden im Ordinatennullpunkt, K_a = 14.7 mmol/l. Die aus beiden Auftragungen unabhängig von einander ermittelten Werte für K_a entsprechen sich sehr gut.

4.3.5.4 K^+-Abhängigkeit

Für die Untersuchungen der K^+-Abhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase wurden nur nicht aktivierte Proben verwendet, da die SDS-Aktivierungsmedien nicht K^+-frei waren (siehe 4.3.4).

K^+ aktiviert die Ouabain-sensitive ATPase-Aktivität.

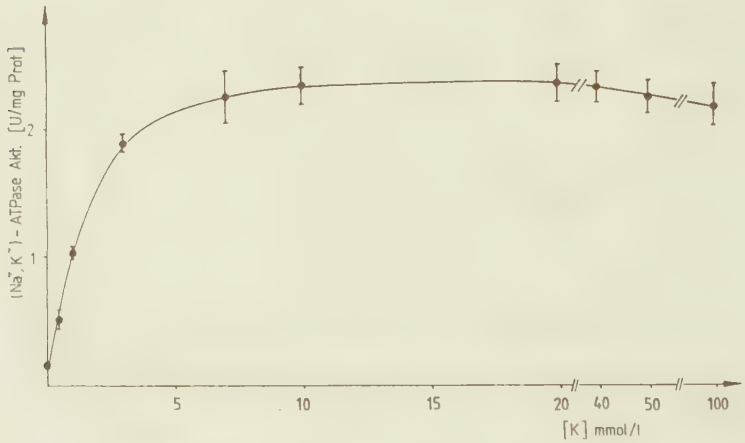


Abb. 26: K^+-Abhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität ohne SDS-Aktivierung, Testbedingungen siehe 3.7.1, $\bar{x} \pm s_m$ n = 3, 100 mmol/l Na^+ im Test.

Die maximale (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität ist bei 10 mmol/l K^+ unter Anwesenheit von 100 mmol/l Na^+ erreicht. Bis 100 mmol/l K^+ im Testansatz ist kein signifikanter Unterschied der Aktivität festzustellen. Unter K^+-freien Bedingungen lassen sich mit 5 mmol/l Ouabain nur noch ca. 7 % der vorhandenen ATPase-Aktivität unterdrücken (Abb. 26).

Auch der Lineweaver-Burk-Plot der K^+-Abhängigkeit zeigt eine leichte Biegung nach oben (nicht dargestellt). Die Errechnung der scheinbaren K_a für K^+ ist daher fehlerhaft. Im Gegensatz dazu ist der Hanes-Woolf-Plot linear.

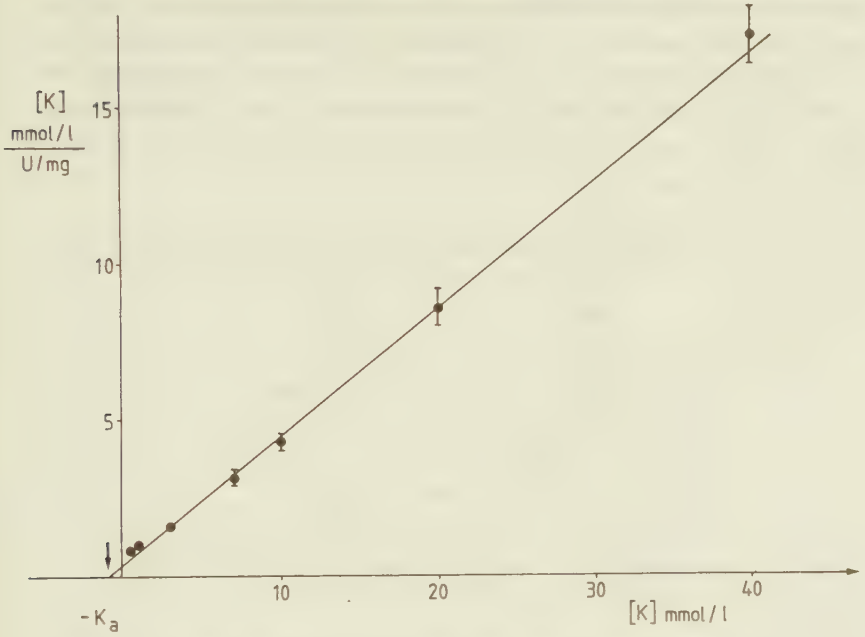


Abb. 27: Hanes-Woolf-Plot der Daten aus Abb. 26 bis 40 mmol/l K^+-Konzentration.

Die Regressionsgerade des Graphen im Hanes-Woolf-Plot hat den Korrelationskoeffizienten r = 0.999 (Abb. 27). Die scheinbare K_a für K^+ ist gleich 0.91 mmol/l. Der V_{max}-Wert für die nicht-aktivierte (Na^+,K^+)-ATPase kann aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate errechnet werden (K_a/V_{max}). V_{max} entspricht 2.39 U/mg.

4.4 Charakterisierung des Na^+/H^+-Austauschers

Ein Na^+/H^+-Austauschmechanismus in den Kiemen einiger Kurzschwanzkrebse kann aufgrund von Literaturdaten (siehe 1.2.2) postuliert werden. Zum Nachweis des Na^+/H^+-Austauschers wurden isolierte Membranfraktionen posteriorer Kiemen von E. sinensis auf dessen Aktivität hin untersucht. Zur Aktivitätsmessung und Charakterisierung des Na^+/H^+-Austauschers in den Membranvesikeln wurde die pH-Gradient abhängige AO-Aufnahme gemessen (siehe 3.12.1).

4.4.1 Na^+/H^+-Austauscher-Aktivität im Ficoll-Stufengradienten

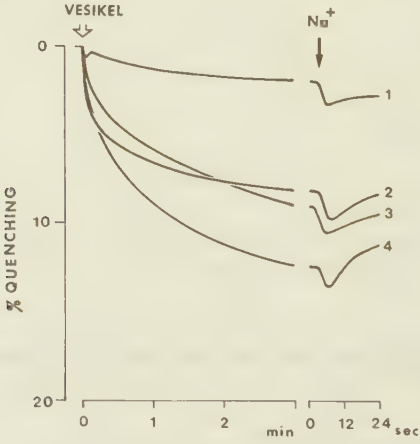


Abb. 28: Na^+-Gradient-abhängiger Aufbau eines pH-Gradienten sowie Fluoreszenzwiederkehr nach Injektion von 75 mmol/l Na^+, 1 = Fraktion G 5 105 µg Protein, 2 = G 2 39 µg Protein, 3 = G 4 52 µg Protein, 4 = G 3 122 µg Protein, Versuchsbedingungen siehe 3.12.2.1, + 2.5 µmol/l Valinomycin.

Werden die in den Fraktionen enthaltenen Membranvesikel mit 150 mmol/l Na^+ beladen und in den Na^+-freien Inkubationspuffer injiziert, ist eine spontane Abnahme (Quench) des ursprünglichen Fluoreszenzsignals von AO festzustellen. Die Injektion von 75 mmol/l Na^+ nach 3 Min. bewirkt eine Fluoreszenzwieder-

kehr, deren Rate von der eingesetzten Fraktion abhängig ist (Abb. 28).

Die Rate der Fluoreszenzwiederkehr ist von der eingeszten Proteinmenge abhängig.

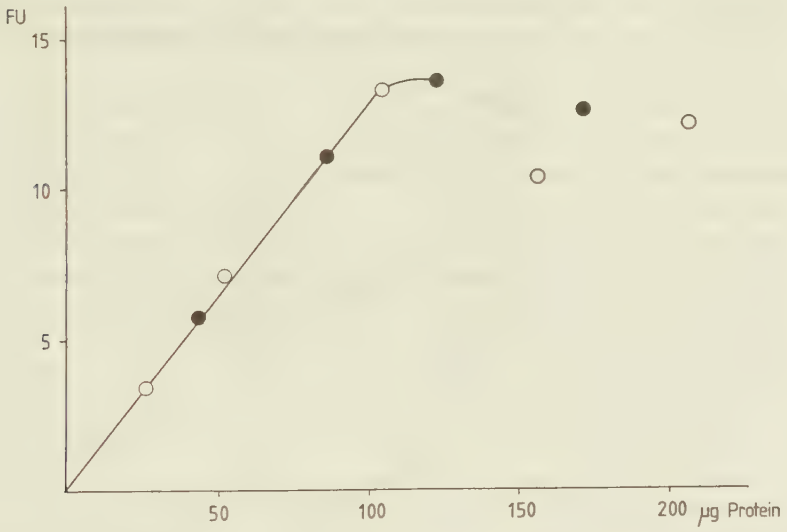


Abb. 29: Proteinabhängigkeit der Rate der Fluoreszenzanstiegs nach Injektion von 75 mmol/l Na^+, Fraktion G 3, Proteinmenge in 2 ml Inkubationspuffer, $\bar{x}$ aus Doppelwerten einer Präparation sowie Einfachwerte einer weiteren Präparation.

Die Aktivität des Na^+/H^+-Austausches ist von der eingeszten Proteinmenge in einem linearen Verhältnis abhängig. Oberhalb von ca. 110 µg Protein (Fraktion G 3) ist ein rasches abknicken der Kurve festzustellen (Abb. 29). Eine Berechnung der spezifischen Aktivität ist also im linearen Bereich der Proteinabhängigkeit möglich.

Die höchsten Aktivitäten mit $\bar{x}$ 160 FU/mg (G 2) und 153. FU/mg, bezogen auf die Rate der Fluoreszenzwiederkehr nach der Injektion von 75 mmol/l Na^+, sind in den Zellmembranfraktionen zu finden (siehe Tabelle 2). Fraktion G 5 , die den größten

Mitochondrienanteil enthält, zeigt mit 80 FU/mg das geringste Signal, obwohl die eingesetzten Proteinmengen nahezu identisch zu G 3 sind.

Alle weiteren Untersuchungen wurden mit Fraktion G 3 durchgeführt.

4.4.2 Wirkung von Ionophoren auf den Na^+/H^+-Austausch

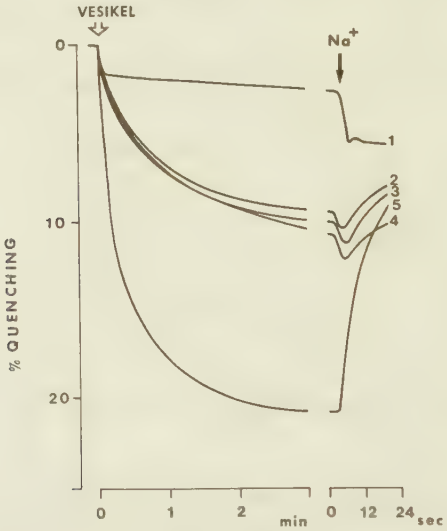


Abb. 30: Na^+-abhängiger Aufbau einer pH-Differenz und Fluoreszenzwiederkehr nach Na^+-Injektion, Versuchsbedingungen siehe 3.12.2.1, 92 µg Protein im Test, Injektion von 75 mmol/l Na^+, 1 = Na^+ innen = außen, 2 = 150 mmol/l Na^+ innen 0 außen, 3 wie 2 + 0.5 % Ethanol, 4 wie 2 + 2.5 µmol/l Valinomycin, 5 wie 2 + 1.0 µg Gramicidin.

Werden die mit 150 mmol/l Na^+ beladenen Membranvesikel in einen Inkubationspuffer mit gleicher Na^+-Konzentration gegeben, ist nur eine unspezifische Fluoreszenzabnahme von 1-2 % zu sehen. Nach der Na^+-Injektion ist lediglich ein Verdünnungseffekt zu beobachten (Abb. 30, Kurve 1).

In Na^+-freien Inkubationspuffer injizierte, Na^+-beladene Membranvesikel bewirken einen Quench (Kurve 2). Das Äquilibrium ist nach ca. 3 Min. erreicht. Nach Injektion von 75 mmol/l Na^+ zeigt sich ein geringer Verdünnungseffekt, der aber nach ca. 3 sec durch einen schnellen Anstieg der Fluoreszenz überlagert wird. Die Anstiegsrate beträgt in diesem Fall 13.2 Fluoreszenzeinheiten pro Minute (FU). Durch Zugabe von 0.5 % Ethanol wird das Signal nicht verändert (3).

Da auf beiden Seiten der Vesikelmembran 10 mmol/l K^+ vorhanden sind, kann durch die künstliche Erhöhung der Leitfähigkeit für K^+ mit Hilfe von Valinomycin die Membran "kurzgeschloßen" werden. Ein elektrogener Na^+/H^+-Austausch wird in diesem Fall reduziert (4). Der Quench verändert sich bei dieser Vesikelpräparation nur unwesentlich. Die Rate der Fluoreszenzwiederkehr nach Na^+-Injektion ist mit 9.9 FU jedoch um 25 % reduziert. Im Durchschnitt aller Präparationen (n = 5) reduzierte sich die Rate nur um 9.1 %. Das Restsignal von 90.9 % ist auf den elektroneutralen Na^+/H^+-Austauscher zurückzuführen.

Die Zugabe des Kanal-bildenden Ionophors Gramicidin führt zu einem künstlichen, elektrogenen Na^+/H^+-Austausch. Der Quench erhöht sich auf mehr als das Doppelte (5). Auch die Rate der Fluoreszenzwiederkehr steigt stark an.

4.4.3 Na^+-Abhängigkeit des Na^+/H^+-Austauschers

Durch Vorinkubation in einem Puffer von pH 6.0 wird das Innere der Membranvesikel angesäuert. Injektion dieser Vesikel in einen Inkubationspuffer mit pH 8.0 führt zur Akkumulation von AO im Inneren, und somit zu einer raschen Fluoreszenzabnahme.

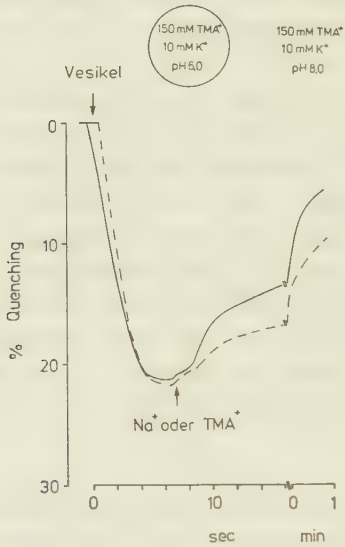


Abb. 31: pH-Sprung Experiment, Injektionen : — 75 mmol/l Na-Glukonat, - - - 75 mmol/l TMA-Glukonat, 150 µg Protein im Test. Versuchsbedingungen siehe 3.12.2.2.

Nach 6-8 Sekunden ist der höchste Quench erreicht. Eine spontane Fluoreszenzwiederkehr ist zu beobachten, die nach Injektion von 75 mmol/l Na^+ deutlich beschleunigt wird. Wird TMA^+ anstatt von Na^+ injiziert, ist nur ein sehr schwacher Effekt zu erkennen. Die Erhöhung der Fluoreszenzwiederkehrrate ist ein Maß für die Na^+/H^+-Austausch-Aktivität. Allerdings schwankten die Ergebnisse paralleller Testansätze sehr stark, was auf den nur 1-2 Sek. andauernden Effekt zurückzuführen ist.

Für die Untersuchungen der kinetischen Eigenschaften des Na^+/H^+-Austauschers ist ein anderer Testansatz verwendet worden. Hier wird das natürliche Vorkommen des Na^+/H^+-Austauschers in den Membranen für die Ansäuerung des Vesikelinneren ausgenutzt. Allerdings sind bei diesem Testansatz zum Zeitpunkt der Na^+-Injektionen bereits 3.7 mmol/l Na^+ im Medium enthalten.

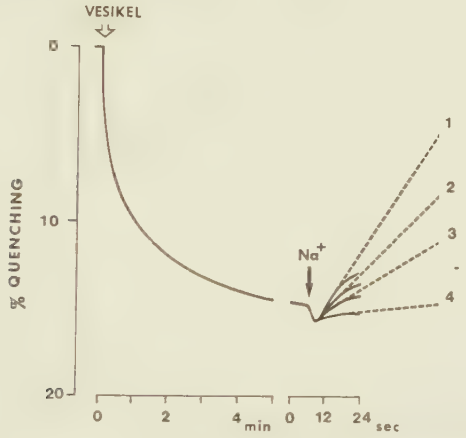


Abb. 32: Abhängigkeit der Fluoreszenzanstiegsrate von der injizierten Na^+-Konzentration, 1 = 75 mmol/l, 2 = 16.4 mmol/l, 3 = 4.1 mmol/l NaCl, 4 = 75 mmol/l TMACl, 122 µg Protein im Test, 2.5 µmol/l Valinomycin.

Die Rate der Fluoreszenzwiederkehr ist von der Na^+-Konzentration abhängig. Die Anfangsgeschwindigkeit wird durch Anlegen einer Tangente an die Kurve bestimmt. Die erhaltenen Werte werden um die Kontrolle (Kurve 4) korrigiert. Die Aktivität dieser Präparation beträgt bei 75 mmol/l Na^+ 136.6 FU/mg.

Die Aktivitäten des Na^+/H^+-Austauschers werden in Prozent der maximalen Aktivität dargestellt, weil die Werte der einzelnen Präparationen zwischen 136.6 FU/mg und 513.6 FU/mg variieren.

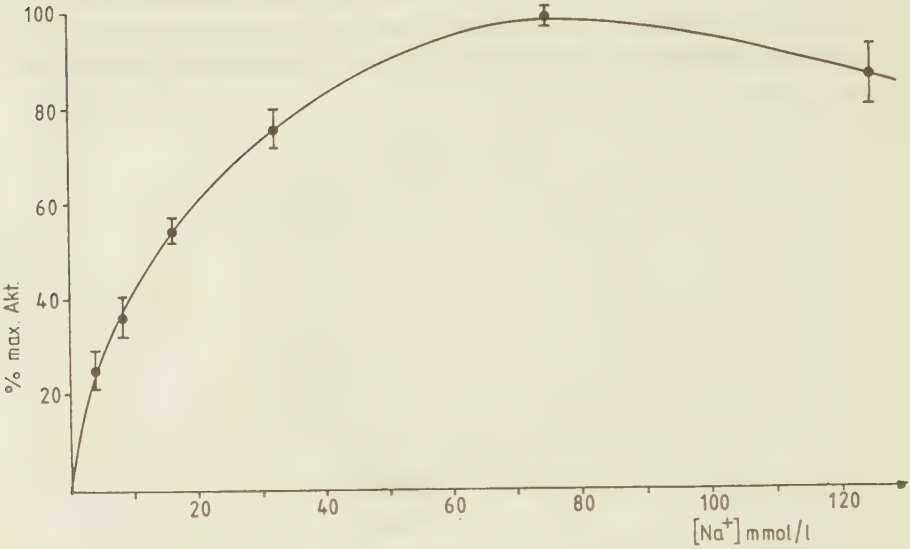


Abb. 33: Abhängigkeit des elektroneutralen Na^+/H^+-Austausches von der injizierten Na^+-Konzentration, $\bar{x} \pm s_m$ n = 5.

Aktivitäten der Na^+-Variation zeigen eine Sättigungskinetik. Die leichte, nicht signifikante Hemmung bei 125 mmol/l Na^+ ist höchstwahrscheinlich auf einen höheren Verdünnungseffekt durch die Injektion eines größeren Volumens als bei allen anderen Na^+-Konzentrationen zurückzuführen.

Die Lineweaver-Burk-Auftragung der Daten aus Abbildung 33 zeigt eine Michaelis-Menten Kinetik.

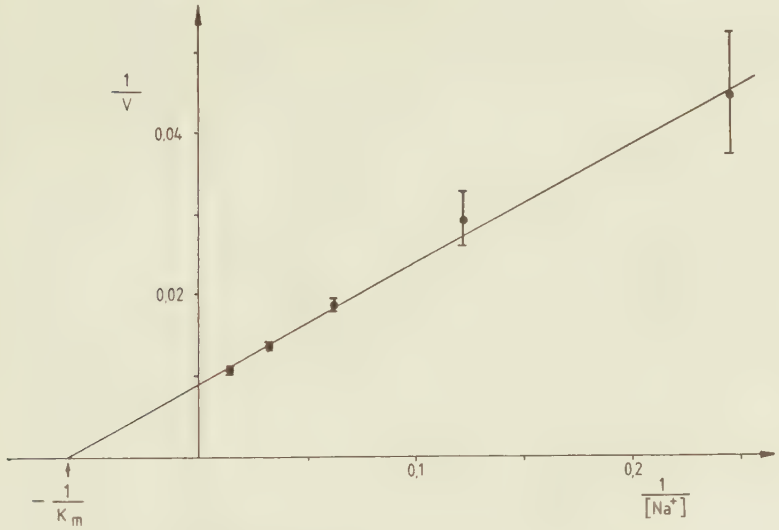


Abb. 34: Lineweaver-Burk-Plot der Daten aus Abb. 33.

Der Lineweaver-Burk-Plot ist linear, der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden beträgt r = 0.997. $K_{0.5}$ für Na^+ beträgt 16.6 mmol/l. V_{max} wurde nicht bestimmt, da die Daten für v lediglich Prozentwerte repräsentieren, und somit wenig ausagekräftig sind. Allerdings ist bemerkenswert, daß der Schnittpunkt der Geraden unterhalb 0.01 liegt, d.H. V_{max} ist größer als die Aktivität, die beim 100 %-Wert (75 mmol/l Na^+) gemessen wird.

Der Hill-Plot der Na^+-Abhängigkeit ist linear.

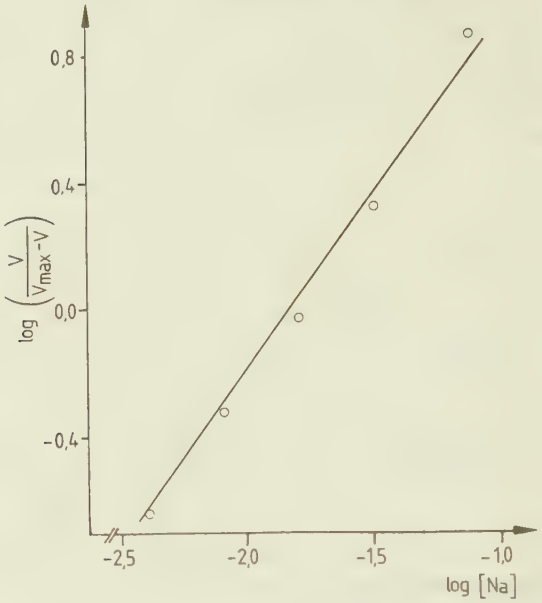


Abb. 35: Hill-Plot der Daten aus Abb. 33, n_H = 1.10, r = 0.991, $\bar{x}$ n = 5, der V_{max}-Wert wurde aus Abb. 34 berechnet.

Der Hill-Koeffizient (n_H), der gleich der Steigung der Regressionsgeraden ist, liegt bei 1.1. Es liegt also keine Kooperativität und so mit nur eine Bindungsstelle für Na^+ vor.

4.4.4 Hemmung durch Amilorid

Um festzustellen, ob Amilorid als Hemmstoff auch auf den Na^+/H^+-Austauscher der posterioren Kiemen von E. sinensis wirkt, wurden Tests mit unterschiedlichen Konzentrationen von Amilorid durchgeführt.

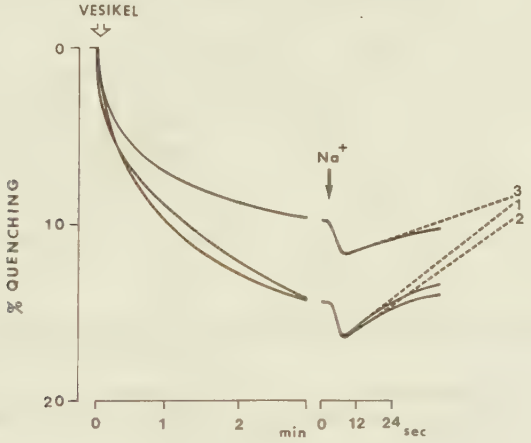


Abb. 36: Na^+-abhängiger Fluoreszenzanstieg von AO bei verschiedenen Amiloridkonzentrationen 1 = 10^{-5} mol/l, 2 = 5 x 10^{-5} mol/l, 3 = 10^{-4} mol/l, Injektion 16.4 mmol/l Na^+, 92 µg Protein im Test.

Niedrige Amiloridkonzentrationen (Kurve 1 + 2) bewirken kaum eine Veränderung des Quenchsignals. 1 x 10^{-4} mol/l Amilorid reduzieren dieses Signal um ca. 30 %. Die Aktivität des elektroneutralen Na^+/H^+-Austausches nach der Na^+-Injektion wird in jedem Fall beeinflußt. Die Aktivitäten dieser Präparation betrugen bei 16.4 mmol/l Na^+ ohne Amilorid 96.5 FU/mg, bei 1 x 10^{-5}mol/l Amilorid 86.8 FU/mg (1), bei 5 x 10^{-5}mol/l Amilorid 79.3 FU/mg (2) und bei 1 x 10^{-4}mol/l Amilorid 37.6 FU/mg (3).

Zur Untersuchung des Hemmechanismus wurde die Na^+-Konzentration bei den oben genannten Amiloridkonzentrationen variiert.

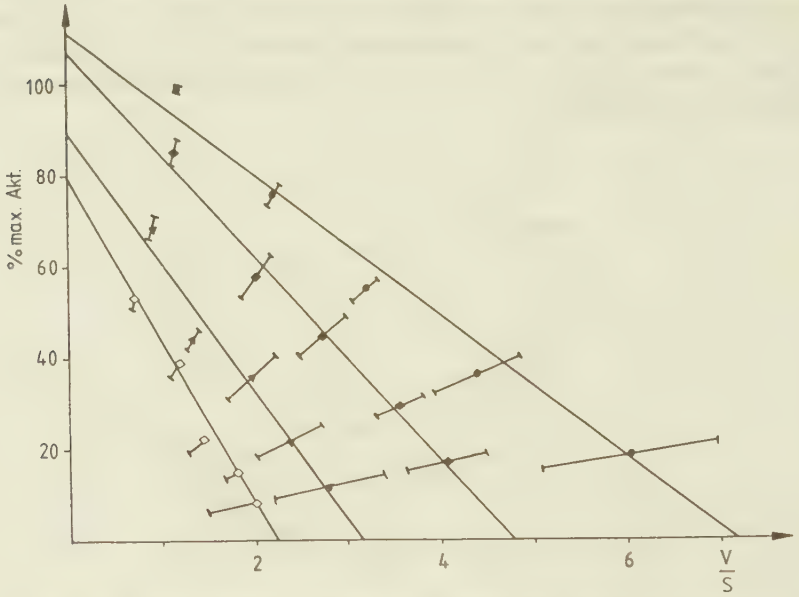


Abb. 37: Eadie-Hofstee-Plot der Na^+-Abhängigkeiten bei verschiedenen Amiloridkonzentrationen, ● 0, ◆ 10^{-5} mol/l, ▼ 5×10^{-5} mol/l, ◇ 10^{-4} mol/l, $\bar{x} \pm s_m$ n = 5.

Die Eadie-Hofstee Auftragung ist sehr gut geeignet, um eventuelle Veränderungen der kinetischen Parameter $K_{0.5}$ und V_{max} darzustellen. Die Reduzierung der Werte für die Ordinatenschnittpunkte der Regressionsgeraden (V_{max}) ist klar erkennbar. Die Steigungen der Geraden, deren negativer Wert gleich $K_{0.5}$ für Na^+ ist, erhöhen sich. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß eine "mixed type" Hemmung vorliegt.

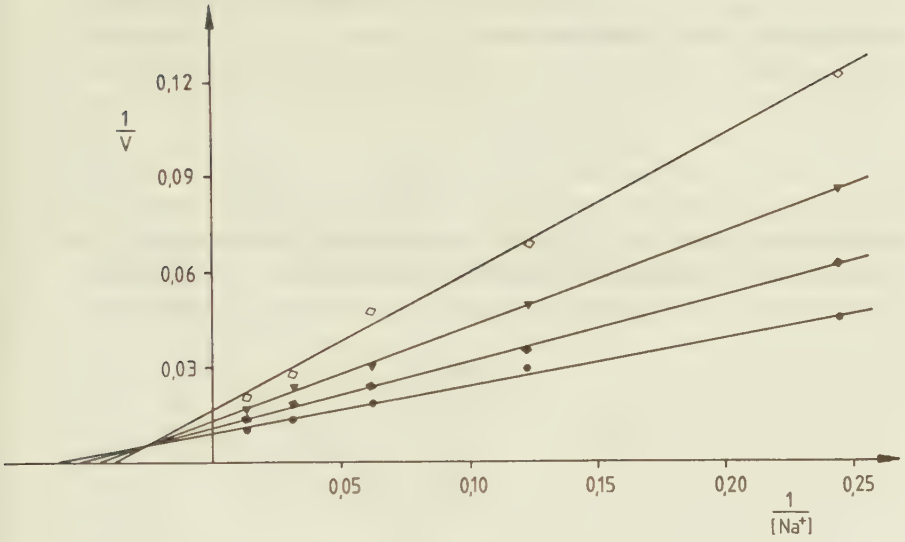


Abb. 38: Lineweaver-Burk-Plot der $^{+}$ Na -Abhängigkeiten bei verschiedenen Amiloridkonzentrationen siehe Abb. 37, $\bar{x}$ n = 5.

Der Lineweaver-Burk Plot zeigt das gleiche Ergebnis. $K_{0.5}$ und V_{max} verändern sich mit steigender Amiloridkonzentration. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden liegt im 2. Quadranten, das typische Bild für die "mixed type" Hemmung.

Amilorid wirkt als kompetitiver sowie als nicht-kompetitiver Inhibitor. Die Dissoziationskonstante für den kompetitiven Anteil K_i muß kleiner sein als die des nicht-kompetiven Anteils K'_i, da die scheinbaren $K_{0.5}$ Werte mit zunehmender Amiloridkonzentration ansteigen (Dixon & Webb 1979). Die Kinetik des Na^+/H^+-Austauschers in Gegenwart eines Hemmstoffes kann durch die Gleichung

$$v = \frac{V_{max}}{\frac{K_s}{(s)}\left(1+\frac{i}{K_i}\right) + 1+\frac{i}{K'_i}}$$

beschrieben werden.

Der Schnittpunkt der Geraden aus dem Lineweaver-Burk-Plot mit der y-Achse wird durch den Term

$$\frac{1 + \frac{i}{K'_i}}{V_{max}}$$

beschrieben. Werden die erhaltenen Schnittpunkte gegen die Amiloridkonzentration in einem Sekundärplot aufgetragen, läßt sich durch Berechnung der Regressionsgeraden K'_i ermitteln.

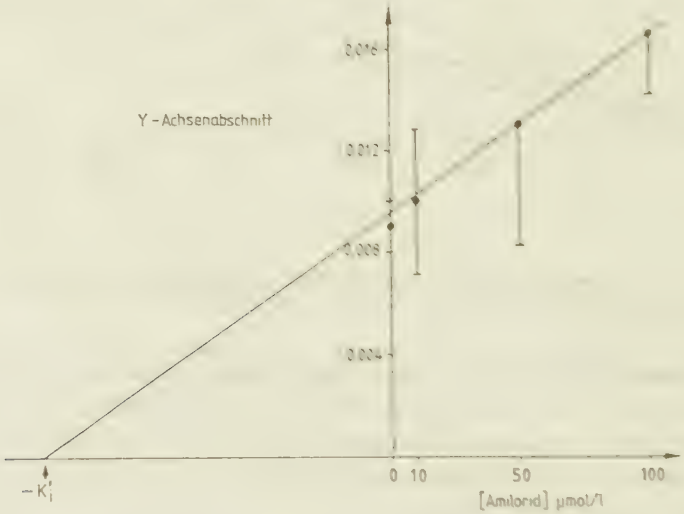


Abb. 39: Abhängigkeit der y-Achsenabschnitte der Graphen aus den Lineaver-Burk-Plots von der Amiloridkonzentration, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ n = 5.

Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse im Ordinatennullpunkt entspricht $- K'_i$. Die Dissoziationskonstante für den nicht-kompetitiven Anteil der Amiloridhemmung hat somit den Wert $K'_i = 1.37 \times 10^{-4}$ mol/l.

Aufgrund der veränderten Steigungen der Geraden des Lineweaver-Burk-Plots (Abb. 38) ergeben sich die verschiedenen scheinbaren $K_{0.5}$ Werte für Na^+. Die Steigungen werden durch den Term

$$\frac{K_s\left(1 + \frac{i}{K_i}\right)}{V_{max}}$$

beschrieben. Werden die Steigungen im Sekundärplot gegen die Amiloridkonzentration aufgetragen, so läßt sich K_i ermitteln.

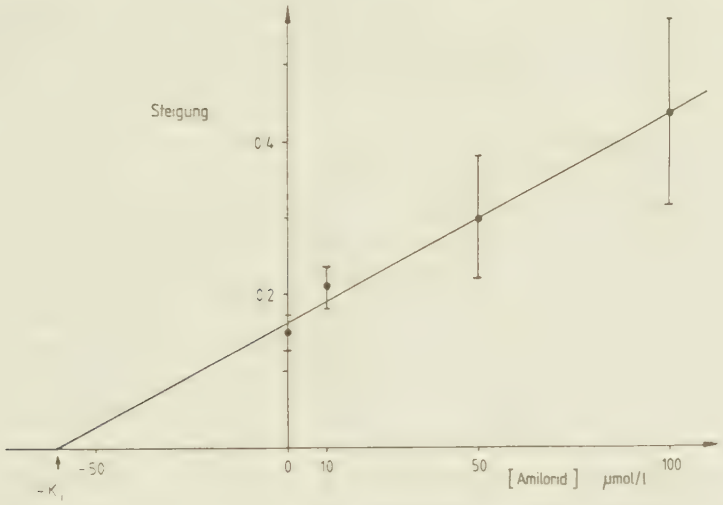


Abb. 40: Einfluß der Amiloridkonzentration auf die Steigungen der Graphen aus den Lineweaver-Burk-Plots, $\bar{x} \pm s_m$ n = 5.

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit x-Achse im Ordinatennullpunkt ist gleich - K_i. Die Dissoziationskonstante für den kompetitiven Anteil der Amiloridhemmung hat den Wert $K_i = 6.12 \times 10^{-5}$ mol/l.

5. Diskussion

5.1 Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase

Das Phänomen der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivierung durch Detergentien wird allgemein auf die Erhöhung der Permeabilität von Vesikelmembranen zurückgeführt (Jørgensen & Skou 1971, Forbush III 1983b). Die Bestimmung der (Na^+,K^+)-ATPase Aktivität hängt danach nicht allein von der Menge des Enzyms in einer Zellmembranpräparation ab, sondern auch davon in welchem Maß die Liganden Na, K, Mg und ATP ihre jeweiligen Bindungsstellen erreichen können. Das Ausmaß der Aktivierung durch Detergentien hängt von der Anzahl geschlossener Vesikel und ihrer Orientierung in einer Präparation ab.

In dieser Arbeit wurde die SDS-Aktivierungsmethode nach Forbush III (1983a) verwendet. Der Vorteil dieser Methode liegt in der verhältnismäßig unempfindlichen Reaktion der (Na^+,K^+)-ATPase auf das Membranprotein : Detergens Verhältnis. Das breite Plateau der Aktivierung, erreicht durch die Pufferwirkung des RSA, macht es nicht mehr, notwendig für jede Präparation, wie von Jørgensen (1974a) vorgeschlagen, das optimale SDS : Protein Verhältnis neu zu bestimmen. Allerdings muß die SDS-Konzentration mit ca. 0.7 mg/ml im Aktivierungsmedium 5-fach höher sein als ohne RSA-Pufferung. Diese SDS-Konzentration hat sich für verschiedene Präparationen als optimal herausgestellt: für Membranen aus der Hundeniere, des Kaninchengehirn und dem elektrischen Organ des Aals (Forbush III 1983a), sowie für die Kiemen verschiedener Krebse (diese Arbeit).

Der latente bzw. aktivierbare Anteil der (Na^+,K^+)-ATPase liegt bei den verschiedenen Krebsen im Rohhomogenat zwischen 50 und 61 % der Gesamtaktivität. Im Zuge der Differentialzentrifugation verteilt sich die latente (Na^+,K^+)-ATPase ungleichmäßig in den Fraktionen. Wird das nicht aktivierte Enzym zugrunde gelegt, ist bei allen Krebsen die höchste spezifische Aktivität in der Mitochondrienfraktion (5000 x g) zu messen,

so daß die Verteilung der der SDH sehr ähnlich ist. Das aktivierte Enzym hat die höchste spezifische Aktivität in der groben Zellmembranfraktion (48 000 x g).

Ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren stellt sich relativ schwierig dar, da in den zur Verfügung stehenden Arbeiten auf eine konsequente Darstellung der Verteilung der spezifischen Aktivitäten verzichtet wird. Bei an Seewasser adaptierten U. pugilator (D'Orazio & Holliday 1985) und U. pugnax (Holliday 1985) liegt die spezifische Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase für die Rohhomogenate bei 0.8 U/mg bzw. 0.58 U/mg bei nicht aktiviertem Enzym (Inkubationstemperatur 30°C). Die die (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität in der Mitochondrienfraktion (11 000 x g) ist nicht erwähnt. In der nicht aktivierten Mikrosomenfraktion (100 000 x g) liegt die Aktivität bei 3.8 bzw. 3.0 U/mg, während durch Aktivierung mit DOC die Aktivität bei U. pugnax auf 3.8 U/mg ansteigt. Dieser 1.26-fache Anstieg entspricht sehr gut dem von Unverzagt (1981) beim gleichen Tier gezeigten Wert (1.29-fach). Werden die für U. pugilator (Holliday 1985) angegebenen spezifischen Aktivitäten auf die in dieser Arbeit verwendete Reaktionstemperatur von 37°C bezogen, sind sie mehr als doppelt so hoch. Allerdings bestätigen sich die Befunde anderer Autoren (Jørgensen & Skou 1971, Jørgensen 1974a, Forbush III 1983a), daß die Aktivierung durch DOC bedeutend geringer ist, als die hier durch SDS gefundene.

Ein spezieller Vorteil der SDS-Aktivierungsmethode ist in dem Erhalt der nativen Membranen während der Präparation zu sehen, obgleich die (Na^+,K^+)-ATPase zur tatsächlichen Bestimmung ihrer spezifischen Aktivität und Ausbeute im aktivierten Zustand gemessen werden kann. Die Bestimmung weiterer Enzyme sowie Transportuntersuchungen werden durch die Aktivierung nicht beeinflußt, da nur kleine Aliquots der jeweiligen Fraktion der Detergensbehandlung für den (Na^+,K^+)-ATPase-Test unterzogen werden.

Die Erhöhung der spezifischen Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase

durch Anpassung der Tiere an verdünnte Salinitäten ist auch durch die Messung des aktivierten Enzyms nachzuweisen. Allerdings können Befunde nicht bestätigt werden, daß diese Adaptationsleistung in besonderem Maß in der Mitochondrienfraktion feststellbar ist (Pequeux et al. 1983, Wanson et al. 1984). Wenn adaptationsbedingte Erhöhungen feststellbar sind, z.B. bei U.pugilator und C. maenas, wird der Unterschied in der groben Membranfraktion (M) am deutlichsten. Gleichwohl ist die Erhöhung in allen Fraktionen zu erkennen. Daß bei E. sinensis kein Unterschied der Aktivitäten erkennbar wird, ist möglicherweise auf die Anpassung von Süßwasser auf Seewasser zu erklären. Anpassungsversuche in gleicher Richtung bewirken einen langsamen zeitlichen Verlauf der Aktivitätsabnaheme bei C. sapidus (Neufeld et al. 1980) und C. maenas (Siebers et al. 1983). In beiden Fällen sind nach 18 bzw. 20 Tagen noch nicht wieder die (Na^+,K^+)-ATPase Aktivitäten der normalen Seewassertiere erreicht.

Die Adaptation der chinesischen Wollhandkrabbe von Meerwasser an Süßwasser ruft ebenfalls eine Erhöhung des Na^+-Influxes in den posterioren Kiemen hervor. Bei einem von innen nach außen gerichteten Na^+-Gradienten von 240 : 25 mequiv/l steigert sich der Na^+-Influx von 10 auf 209 uequiv/g(FG)xh. Das bedeutet eine Induzierung der aktiven Na^+-Aufnahme der Kiemen (Pequeux & Gilles 1981). Ob diese Erhöhung der Transportleistung im Zusammenhang mit der oben erwähnten Erhöhung der spezifischen Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase steht, ist allerdings bisher nicht mit Sicherheit zu sagen.

5.2 Isolierung der Zellmembranen

Zur Identifizierung von Membranvesikeln wird die (Na^+,K^+)-ATPase als basolateraler Marker, die LAP und NDPase als apikale Marker und die SDH als mitochondrialer Marker herangezogen. Diese Lokalisation der Enzyme ist aus anderen Geweben bekannt (Ernst & Mills 1980, Sabolić & Burckhardt 1983a, Hays & Barland 1966, Scott et al. 1983). Die Lokalisation im Epithel der Crustaceenkiemen ist bisher jedoch nicht eindeutig

nachgewiesen. Als Kriterien für die Reinheit der Fraktionen sind die relativen spezifischen Aktivitäten (Anreicherungsfaktoren) zum Rohhomogenat sowie die prozentualen Anteile an der Gesamtaktivität (Ausbeuten) aussagekräftig.

Mit einem Anreicherungfaktor von 3.4 für die (Na^+,K^+)-ATPase in der groben Membranfraktion wird ein relativ gutes Ergebnis bei der Differentialzentrifugation erzielt (siehe Tab. 1). Für Präparationen der basolateralen Membran von Säugetierorganen sind in vergleichbaren Fraktionen mit 2.6 (Rattendünndarm, Scalera et al. 1980), 2.9 (Rattennierenkortex, Inui et al. 1981) und 5.4 (Kaninchennierenkortex, Sheikh et al. 1982) Faktoren ähnlicher Größenordnung bekannt. Die Ausbeute liegt mit 65 % in dieser Fraktion allerdings deutlich über den dort erreichten Werten: 35 % (Scalera et al. 1980), 25 % (Scalera et al. 1981), 14 % (Inui et al. 1981). Zu erwähnen ist noch, daß in der vorliegenden Präparation die Mitochondrienkontamination erheblich höher ist. Vergleichbare Literaturdaten über Membranpräparationen von Crustaceenkiemen stehen nicht zu Verfügung. Berechnungen zur Enzymanreicherung und Daten der Enzymausbeute fehlen.

Für die Markerenzyme der apikalen Membran sind die Anreicherungsfaktoren mit 1.7 und 1.8 geringer, was wahrscheinlich auf den hohen Gehalt an basolateralen und mitochondrialen Membranen zurückzuführen ist. Die Ausbeuten sind mit über 30 % dagegen auch hier deutlich besser als bei den oben genannten Aufarbeitungen (10 - 20 %).

Die Trennung der basolateralen von den apikalen Membranpartikel kann bei Säugetierorganen mit dem selbstorientierenden Percollgradienten erreicht werden (Scalera et al. 1980, Inui et al. 1981, Scalera et al. 1981). Die Anwendung dieses Verfahrens zur weiteren Reinigung der Fraktion M führt nicht zum erwarteten Erfolg (siehe Abb. 10). Die Zellmembranbereiche des Kiemenepithels scheinen in ihrer Schwebedichte weniger differenziert zu sein. Sowohl die basolateralen als auch die apikalen Membranpartikel können zwar weiter angereichert werden,

gleichwohl verbleiben sie gemeinsam im Dichtebereich zwischen 1.035 g/ml und 1.049 g/ml. Die Anreicherung ist auf eine teilweise Abtrennung der Mitochondrien zurückzuführen. Versuche mit verschiedenen Percollkonzentrationen ergeben das gleiche Bild.

Ein weiteres Material, mit dem es möglich ist, Gradienten flach ansteigender Dichte herzustellen, ist Ficoll. Ein isoosmotischer Ficoll-Gradient von 5 -15 % (w/v) deckt den Dichtebereich ab, in dem Zellmembranen zu erwarten sind. Auch durch diese Methode lassen sich die basolateralen und apikalen Zellmembranen des Kiemenepithels nicht voneinander trennen (siehe Abb. 10). Die höchste Konzentration beider Membranbereiche ist bei einer Dichte von 1.050 g/ml zu finden, was eine gute Übereinstimmung mit dem Percoll-Gradienten darstellt. Auch die Na^+/H^+-Austauscher-Aktivität ist hier am höchsten. Die apikalen Membranen dringen allerdings zu einem größeren Teil weiter in den Gradienten ein als die basolateralen. Zusätzlich ist ein höherer Anteil im Sediment wiederzufinden. Die Abtrennung mitochondrialer Membranpartikel ist deutlich besser als im Percoll-Gradienten. Ein ähnliches Experiment mit einem 35 -48 % (w/v) Saccharose-Gradienten zeigt bei Nierenkortexmembranen des Kaninchens eine asymetrische Verteilung beider Membranen (Ives et al. 1983), obwohl mit Saccharose der Gradient nicht so deutlich gespreizt werden kann. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß die apikalen Membranen der Kiemenepithelzellen von Crustaceen eine geringere Dichte aufweisen als die der Niere und des Dünndarms von Säugetieren.

Eine Methode zur speziellen Isolierung apikaler Membranen der Säugetierniere ist die differentielle Salzfällung (Booth & Kenny 1974, Evers et al. 1978). Mit diesem Verfahren sind dort über 10-fache Anreicherungen der apikalen Membranen zu erreichen. Die basolateralen Membranen und andere Zellorganellen sind nur wenig angereichert bzw. abgereichert. In gleicher Weise behandelt verhalten sich die Membranen des Kiemenepithels von *E. sinensis* anders. Obwohl durch die 1. Salzbehandlung bereits 74 % der (Na^+,K^+)-ATPase enthaltenen Membra-

nen ausgefällt werden, ist das Enzym in Fraktion P III, die die apikalen Membranen enthalten sollte, 3.4-fach angereichert. Die apikalen Markerenzyme sind in P III sogar mit 1.8 bzw. 1.3 noch geringer angereichert. Einzig von den Mitochondrien wird Fraktion P III befreit (siehe Tab. 3). Dieses Resultat ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß sich die basolateralen und apikalen Zellmembranbereiche auch in ihrer Oberflächenbeschaffenheit wenig voneinander unterscheiden.

Die besten Ergebnisse zur Zellmembranisolierung werden mit einem 5 und 15 % Ficoll-Stufengradienten erzielt. Die (Na^+,K^+)-ATPase kann bis zu 9.1-fach, die LAP bis zu 5.5-fach, allerdings in der gleichen Fraktion G 2, angereichert werden. Die spezielle Isolierung des einen oder anderen Membranbereiches führt aus Darm- und Nierenepithelien zu ungefähr doppelt so hohen Anreicherungen (Scalera et al. 1980, Inui et al. 1981, Evers et al. 1978). Eine Erklärung hierfür liegt darin, daß G 2 eine Mischfraktion beider Zellmembranbereiche darstellt.

Die spezifische Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase mit 8 U/mg in Fraktion G 2 ist als relativ hoch zu bewerten. Bei 180-facher Anreicherung finden Peterson & Hokin (1980) eine entsprechende Aktivität der aus Artemia salina isolierten (Na^+,K^+)-ATPase. Diese Enzympräparation ist elektrophoretisch nahezu rein. Die isolierte (Na^+,K^+)-ATPase aus der äußeren Medulla der Kaninchenniere (92 % des Gesamtproteins) hat nur eine ca. 4-fach höhere Aktivität von 32-37 U/mg (Jørgensen 1974b).

5.3 Eigenschaften der (Na^+,K^+)-ATPase

Für viele Transportprozesse im Kiemenepithel der Crustaceen ist die (Na^+,K^+)-ATPase als primär aktives Transportsystem verantwortlich (siehe 1.2.1). Die eindeutige biochemische Charakterisierung des Enzyms ist für die Beurteilung der Transportvorgänge auf zellulärer Ebene eine wichtige Voraussetzung.

5.3.1 pH- und Temperaturabhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase

Das pH-Optimum der (Na^+,K^+)-ATPase aus dem Kiemenepithel von E. sinensis liegt zwischen pH 7.2 und 7.5. Dieser Bereich stimmt gut mit dem in anderen Geweben gefundenen überein, und zwar unabhängig von der Herkunft des Enzyms aus Evertebraten und Vertebraten inklusive Säugetieren (Bonting 1970). Die (Na^+,K^+)-ATPase aus Kiemen von U. pugilator (D'Ozario & Holliday 1985) und Macrobrachium rosenbergii (Stern et al. 1984) zeigt ein nahezu identisches Verhalten.

Obwohl die Lebensraumtemperaturen von E. sinensis im Bereich von 5 - 25 °C liegen, ist die maximale (Na^+,K^+)-ATPase Aktivität erst bei 40°C erreicht. Gleiche Ergebnisse werden für andere Crustaceenarten beschrieben, so bei den euryhalinen Arten C. sapidus (Neufeld et al. 1980) und U. pugnax (Holliday 1985) und beim Süßwasserkrebs P. clarki (Horiuchi 1977).

Arrhenius-Plots der (Na^+,K^+)-ATPase - Aktivität zeigen eine Diskontinuität, die im Zusammenhang mit der Fluidität der Membranlipide steht. Die Diskontinuität verschwindet, wenn (Na^+,K^+)-ATPase - Präparationen teilweise von den Lipiden befreit werden (Taniguchi & Iida 1972, Kimelberg & Papahadjopoulos 1974). Extrahierte Lipide solcher Präparationen weisen eine Phasenänderung bei der gleichen Temperatur auf (Charnock & Bashford 1975). Zumeist liegen diese Knickpunkttemperaturen um 20°C (siehe Schuurmans Stekhoven & Bonting 1981). Der Arrhenius-Plot der (Na^+,K^+)-ATPase von E. sinensis zeigt den Knickpunkt T_C bei 20.2°C auf. Allerdings

wurden bei Crustaceen T_c-Werte von 20°C bei U. pugnax (Holliday 1985) über 23.2°C bei C. sapidus (Neufeld et al. 1980) bis 27°C bei P. clarki (Horiuchi 1977) beschrieben.

5.3.2 Ouabainhemmung

Ouabain (g-Strophantin) ist ein spezifischer Hemmstoff der (Na^+,K^+)-ATPase. Es bestehen jedoch beträchtliche Unterschiede in der Effektivität der Hemmung zwischen verschiedenen Tierarten. Allgemein kann man sagen, daß die (Na^+,K^+)-ATPase aus Vertebraten auf um 1 - 2 Größenordnungen niedrigere Ouabainkonzentrationen reagiert, als die der Evertebraten. Eine Ausnahme bildet die Rate (Bonting 1970).

Dieses Bild wird durch neuere Arbeiten an Crustaceenkiemen bestätigt. Die halbmaximale Hemmung der (Na^+,K^+)-ATPase tritt bei allen untersuchten Tieren erst im Bereich um 10^{-4} mol/l ein. Dies trifft für euryhaline oder limnische Kurzschwanz- bzw. Langschwanzkrebse zu (Horiuchi 1977, Neufeld et al. 1980, Wanson et al. 1984, Stern et al. 1984, D'Orazio & Holliday 1985, Holliday 1985). Die scheinbare K_i von Ouabain von 7.9×10^{-5} mol/l für die Hemmung (Na^+,K^+)-ATPase von E. sinensis ordnet sich gut mit in diese Reihe ein. Daß die vollständige Hemmung noch nicht mit 5 mmol/l Ouabain zu erreichen ist, läßt sich durch die relativ hohe K-Konzentration im Test erklären. Bereits 10 mmol/l K^+ erniedrigen die Gleichgewichtsbindung von ^{3}H-Ouabain auf 25 % der maximalen Bindung (Hansen 1974). Möglicherweise könnte also bei kleineren K-Konzentrationen eine vollständige Hemmung erreicht werden. Zusätzlich wäre eine Verschiebung der K_i möglich. Untersuchungen liegen hierzu bei Crustaceen nicht vor.

5.3.3 Mg- und ATP-Abhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase

Daten von kinetischen Untersuchungen der Interaktionen von freiem Mg_f, ATP_f und vom Mg-ATP Komplex mit der (Na^+,K^+)-ATPase sind aufgrund der vielfältigen Wechselwirkungen aller Komponenten schwierig zu interpretieren (siehe 1.3.1.1). Einfache Variationen von Mg und/oder ATP, wie sie häufig verwendet werden, führen zu Ergebnissen, die durch mehrere gleichzeitig stattfindende Reaktionen beeinflußt werden. Die zur Verfügung stehenden Ergebnisse über Abhängigkeiten der (Na^+,K^+)-ATPase aus Crustaceenkiemen von Mg und ATP sind alle unter den oben beschriebenen Meßbedingungen erhalten worden (Horiuchi 1977, Neufeld et al. 1980, Wanson et al. 1984, D'Orazio & Holliday 1985, Holliday 1985).

Die Mg-Variation bei konstantem ATP (3 mmol/l) führt zu einem scheinbaren K_a-Wert für Mg von 1.5 mmol/l (Abb. 18). Diese Variation beinhaltet jedoch eine gleichzeitige Veränderung der Konzentrationen von ATP_f, Mg_f und Mg-ATP. ATP_f beeinflußt außerdem die Affinität der (Na^+,K^+)-ATPase zu Mg_f und umgekehrt (Hexum et al. 1970). Diese scheinbare K_a ist also nicht mehr molekular interpretierbar.

Freie Mg-Konzentrationen in hohen Überschüssen führen zu einer Hemmung der (Na^+,K^+)-ATPase. Nicht-kompetitive (Robinson 1974a) wie auch unkompetitive Hemmechanismen (Hexum et al. 1970) sind beschrieben worden. In jedem Fall stellt Mg_f einen sehr schwachen Inhibitor ($K_{i,app}$ für unkompetitive Hemmung 40 mmol/l) dar. Mg_f ist ein allosterischer Effektor der (Na^+,K^+)-ATPase (Robinson 1972). Es scheint durch 2 verschiedene Bindungsstellen Konformationsänderungen der (Na^+,K^+)-ATPase hervorzurufen (Bonting et al. 1983). Diese Wirkung bezieht sich einerseits auf die Affinitäten des Enzyms zu Na^+ und K^+ (Robinson 1972,1974a) und andererseits auf die ATP-Bindung (Bonting et al. 1983).

Die Variation des Mg_f zeigt, daß Konzentrationen zwischen 0.5 und 11 mmol/l die (Na^+,K^+)-ATPase Aktivität kaum beeinflussen (Abb. 19). Aus dem Abfall der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität unterhalb von 0.5 mmol/l Mg_f wird allerdings deutlich, daß Mg_f für die Aktivität notwendig ist. Die scheinbare K_a für Mg_f liegt bei 68 µmol/l. Von anderen Autoren werden mit 2.3 µmol/l für die (Na^+,K^+)-ATPase aus Rattengehirn (Robinson 1974b) und 13 µmol/l aus dem äußeren Mark der Hundeniere (Garrahan et al. 1982) niedrigere Werte angegeben.

Es existieren 2 Bindungsstellen mit hoher bzw. niedriger Affinität für ATP (Robinson 1976). Die Bindungsstelle hoher Affinität mit einer K_m um 1 µmol/l ist wahrscheinlich Mg-unabhängig (Nørby & Jensen 1971, Skou 1974). Hier wird das Enzym phosphoryliert (Bonting et al. 1983), allerdings nur, wenn Mg vorhanden ist. Die zweite Bindungsstelle mit niedriger Affinität (K_m oberhalb 10^{-4} mol/l) ist Mg-abhängig und wird nicht phosphoryliert (Schuurmans Stekhoven et al. 1981). Die Existenz dieser beiden ATP-Bindungsstellen ist immer noch umstritten (siehe Nørby 1983). Ein Modell, das die unterschiedlichen Befunde erklären kann, wurde von Levitt (1980, siehe auch 1.3.1.2) vorgestellt. Besonders interessant ist hierbei, daß nunmehr die Möglichkeit besteht, die Befunde aus der hydrolytischen Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase zu beurteilen. Wird die Aktivität über die Messung des abgespaltenen Phosphats bestimmt, werden K_m-Werte oberhalb 10^{-4} mol/l bestimmt, die der Bindungsstelle niedriger Affinität entsprechen. Bei diesen Versuchen muß man davon ausgehen, daß die hochaffine Bindungstelle immer abgesättigt ist. Der gesamte Ablauf eines Reaktionszyklus ist aber nur gewährleistet, wenn beide Bindungsstellen besetzt werden können. Voraussetzung hierfür ist allerdings das Vorliegen eines nativen (Na^+,K^+)-ATPase-Dimers (bzw. Tetramers unter Berücksichtigung der Alpha- und Beta-Untereinheiten).

Die Substratvariation der (Na^+,K^+)-ATPase mit Mg-ATP in dieser Arbeit ist unter Mg-Überschußbedingungen durchgeführt worden. Die Mg_f-Konzentrationen variierten zwischen 3.4 und 9.8

mmol/l. Ein Konzentrationsbereich der die (Na^+,K^+)-ATPase nur minimal beeinflußt (siehe Abb. 18). Freies ATP lag mit 0.004 - 0.4 mmol/l auch deutlich unterhalb der scheinbaren Hemmkonstanten K_i von 4.8 mmol/l (Robinson 1974a). Unter diesen Voraussetzungen ist der hier ermittelte K_m-Wert von 2.3×10^{-4} mol/l für Mg-ATP nahe dem "wahren" K_m-Wert und entspricht höchstwahrscheinlich der Konstanten an der Bindungsstelle niedriger Affinität. K_m-Werte gleicher Größenordnung werden bei anderen Crustaceenkiemen gezeigt, wenn ATP bei hoher Mg-Konzentration variiert wird: 1.9×10^{-4} mol/l C. sapidus (Neufeld et al. 1980), 5.6×10^{-4} mol/l U. pugnax (Holliday 1985), 4.8×10^{-4} mol/l U. pugilator (D'Orazio & Holliday 1985).

5.3.4 Na^+- und K^+-Abhängigkeit

Bei Untersuchungen der hydrolytischen Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase kann der Einfluß von Na^+ und K^+ nur in Bezug auf den gesamtem Reaktionszyklus (siehe 1.3.1.1) bestimmt werden, da beide Kationen unabdingbar für den Ablauf vorhanden sein müssen. Die Affinitäten von Na^+ und K^+ zum Enzym hängen von der Konformation im Reaktionsteilschritt ab (Skou 1983). Eine Kompetition beider Ionen ist sowohl im Konformationszustand hoher Na-Affinität als auch hoher K-Affinität möglich, sie resultiert allein aus dem Konzentrationsverhältnis der beiden. Aufgrund dessen lassen sich nur scheinbare K_a-Werte berechnen.

Die maximale Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase wird bei einer Na^+-Konzentration um 100 mmol/l bei 20 mmol/l K^+ erreicht. Bei bis zu 300 mmol/l Na^+ bleibt die Aktivität konstant. Andere Autoren berichten von einer Hemmung der Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase aus Crustaceenkiemen oberhalb 100 mmol/l Na^+ (Siebers et al. 1983, Wanson et al. 1984). Diese Hemmung kann durch Kompetition von Na^+ um die K^+-Bindungsstelle während des Konformationszustandes hoher K^+-Affinität hervorgerufen werden, wenn K^+ in zu geringer Konzentration eingesetzt wird (Skou 1974). Außerdem kann dieser Effekt durch die Veränderung der Ionenstärke auftreten (Skou 1979). Die scheinbare K_a für Na^+

der (Na^+,K^+)-ATPase aus Kiemen von E. sinensis liegt mit 14 mmol/l relativ hoch. In anderen tierischen Geweben werden Werte zwischen 1 und 12.5 mmol/l gefunden (Bonting 1970). Allerdings wurden diese Werte bei bedeutend niedrigerer K^+-Konzentration von 5 mmol/l erhoben.

K^+-Konzentrationen zwischen 5 und 10 mmol/l aktivieren die (Na^+,K^+)-ATPase von Crustaceenkiemen maximal. Hierin stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Literaturangaben überein (Neufeld et al. 1980, Wanson et al. 1984, D'Orazio & Holliday 1985, Holliday 1985). Auch die scheinbaren K_a-Werte liegen im gleichen Bereich zwischen 0.86 mmol/l und 2.4 mmol/l K^+. Ähnliche K_a's werden auch in anderen Geweben gefunden (Bonting 1970). Optimale Aktivitäten werden allgemein bei einem Na^+ : K^+ Verhältnis von 5 - 10 beobachtet (Schuurmans Stekhoven & Bonting 1981). Auch die (Na^+,K^+)-ATPase aus Kiemen von E. sinensis zeigt dieses Verhalten.

Die Na^+-Abhängigkeit der (Na^+,K^+)-ATPase zeigt keine reine Michaelis-Menten-Kinetik. Im Lineweaver-Burk-Plot erhält man leicht nach oben gebogene Graphen, was auf einen kooperativen Effekt der Na^+-Bindung hinweist (4.3.5.3). Bei Fluxmessungen an Erythrozytenmembranen werden sigmoide Aktivierungskurven für Na^+ und K^+ erhalten. Im Lineweaver-Burk-Plot werden Geraden erhalten, wenn $1/v$ gegen $1/(K)^2$ für die K^+-Aktivierung und $1/v$ gegen $1/(Na)^3$ für die Na^+-Aktivierung aufgetragen werden (Sachs & Welt 1967, Garay & Garrahan 1973). Diese Ergebnisse weisen auf drei Na^+-Bindungsstellen sowie zwei K^+-Bindungsstellen hin. Wird die Na^+- bzw. K^+-Aktivierung mit Hilfe der ATP-Hydrolyse untersucht, zeigt sich ein weniger deutliches Bild. Für die K^+-Aktivierung wird im Lineweaver-Burk-Plot eine Gerade erhalten. Für die Na^+-Aktivierung wird ein nach oben gebogener Graph erhalten, der durch Auftragung gegen $1/(Na)^2$ linearisiert werden kann (Peter & Wolf 1972). Noch weniger gebogen stellt sich die Reziprokauftragung der Na^+-Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase aus Kiemen von E. sinensis dar, so daß eine Auftragung gegen $1/(Na)^2$ nicht zu einer Linearisierung sondern zu einer Biegung nach unten führt. Allerdings läßt

sich durch die Hill-Auftragung eine leichte positve Kooperativität feststellen. Der Hill-Koeffizient n_H ist gleich 1.34, und deutet somit auch bei der (Na^+,K^+)-ATPase von E. sinensis auf mehr als eine Na^+-Bindungsstelle hin.

5.4 Der Na^+/H^+-Austauscher

Der Na^+/H^+-Austauscher ist in Zellmembranen einer Vielzahl von tierischen Zellen ist der lokalisiert. Er bewirkt einen Protonenausstrom aus der Zelle, angetrieben durch den Na^+-Einstrom aufgrund des Konzentrationsgefälles für Na^+ von außen nach innen. Dieser Prozess ist mitverantwortlich für eine Reihe von physiologischen Funktionen, bei denen die Na^+-Aufnahme und Protonenexkretion auf zellulärer Ebene eine Rolle spielt (siehe 1.3.2 und Aronson 1985).

5.4.1 Na^+/H^+-Austausch in Zellmembranvesikeln aus Kiemen von *E. sinensis*

Eine Unterdrückung der AO-Fluoreszenz ist festzustellen, wenn Na^+-beladene Membranvesikel aus Kiemen von *E. sinensis* in ein Na^+-freies Medium gegeben werden (zur Methode siehe 3.12.2.1). Die Höhe der Fluoreszenzlöschung ist abhängig von der eingesetzten Membranfraktion, d.h. nicht alle Membranen aus den Kiemenepithelzellen weisen eine an den Na^+-Ausstrom gekoppelte Protonenaufnahme auf. Die Möglichkeit, daß die Vesikel unterschiedlich gut mit Na^+ beladen sind, kann ausgeschlossen werden, da alle Fraktionen einen starken, Gramicidin-induzierten Na^+/H^+-Austausch zeigen. Die Herkunft der Membranvesikel mit Na^+/H^+-Austauscher – Aktivität aus den Zellmembranen der Epithelzellen ist sehr wahrscheinlich, da die höchsten Aktivitäten in Fraktionen mit hoher Anreicherung dieser Membranen zu finden sind (siehe Tab. 2).

Der Einsatz des K^+-Ionophors Valinomycin und gleichen K^+-Konzentrationen auf beiden Seiten der Vesikelmembranen führt zu elektrischen "Kurzschlußbedingungen" (Reenstra et al. 1981, Sabolić & Burckhardt 1983a). Ein elektrogener Austausch von Na^+ und H^+ kann unter diesen Bedingungen durch die hohe K^+-Leitfähigkeit reduziert bis ausgeschlossen werden. Das Fluoreszenzsignal, hervorgerufen durch die Kiemenzellmembranvesikel, verändert sich hierdurch kaum. Die Rate der Fluoreszenzwiederkehr nach Na^+-Injektion wird allerdings zwischen 0

und 25 % reduziert. Die Restaktivitäten sind auf einen elektroneutralen Na^+/H^+-Austausch zurückzuführen. Diese Reduzierung ist allerdings geringer als die bei Nierenbürstensaummembranvesikel gefundenen (Reenstra et al. 1981, Sabolić & Burckhardt 1983a). Diese Diskrepanz kann in der unterschiedlichen Isolierungsmethode der Membranvesikel begründet sein (Sabolić & Burckhardt 1984). Ebenso könnte die Na^+-Leitfähigkeit im Kiemenepithel geringer als im Bürstensaum der Niere sein. Dem sprechen aber Untersuchungen zum transepithelialen Potential des Kiemenepithels von U. tangeri und C. maenas entgegen (Drews 1985, Siebers et al. 1985). Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß die eingesetzte K^+-Konzentration von 10 mmol/l zu gering gegenüber dem hohen Na^+-Gradienten von 150 mmol/l ist. Daraus würde folgen, daß auch im verbleibenden Restsignal ein elektrogener Anteil enthalten ist, wenngleich die kinetischen Untersuchungen zur Na^+-Abhängigkeit und Amiloridhemmung dagegen sprechen (siehe unten).

5.4.2 Na^+-Abhängigkeit

Die Experimente zur Na^+-Kinetik wurden mit einer modifizierten Methode durchgeführt. Normalerweise wird die Na^+/H^+-Austauscher Aktivität unter Verwendung der AO-Fluoreszenztechnik mit Hilfe von pH-Sprungexperimenten ermittelt (Warnock et al 1982, Sabolić & Burckhardt 1983a, Seiler et al. 1985). Die Ansäuerung des Vesikelinneren kann auch durch den in der Membran enthaltenen Na^+/H^+-Austauscher bewirkt werden. Nach vollständigem Aufbau der pH-Differenz wird die Aktivität des Na^+/H^+-Austauschers bestimmt (siehe Abb. 28). Diese Methode brachte bei den Membranen aus dem Kiemenepithel von E. sinensis reproduzierbarere Ergebnisse. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß nur die Vesikel erfaßt werden, die durch ein in den Membranen lokalisiertes Na^+/H^+-Austauschsystem angesäuert werden.

Die Na^+-abhängige H^+-Abgabe aus Kiemenzellmembranvesikeln zeigt eine Sättigungskinetik. Die maximale Aktivität wird bei 80 mmol/l Na^+ erreicht. Die $K_{0.5}$ bei pH 7.0 für Na^+ ist 16.6 mmol/l. Bei anderen Geweben wurden $K_{0.5}$-Werte von 3 - 50

mmol/l gefunden (siehe Aronson 1985). Im Normalfall liegt die extrazelluläre Na^+-Konzentration deutlich oberhalb dieser Werte, sodaß der Na^+/H^+-Austauscher im Sättigungsbereich für Na^+ arbeitet. Wird die mögliche apikale Lage im Kiemenepithel berücksichtigt, kann der $K_{0.5}$-Wert bei Süßwasseradaptation der Tiere unterschritten werden.

Die Stöchiometrie des Na^+/H^+-Austausches sollte schon wegen der Elektroneutralität 1 : 1 oder andere ganzzahlige, gleich große Verhältnisse beinhalten. Für einen tatsächlichen 1 : 1 Austausch spricht die gefundene einfache Michaelis-Menten Kinetik (siehe Aronson 1985). Außerdem liegt der Hill-Koeffizient für Na^+, in Übereinstimmung mit dieser Arbeit, bei 1 (Warnock et al. 1982).

5.4.3 Hemmung durch Amilorid

Amilorid hat neben seiner Wirkung auf Na^+-Kanäle ebenfalls eine spezifische Hemmwirkung auf den Na^+/H^+-Austauscher, wenngleich die Affinität zum Austauscher deutlich niedriger (2 - 3 Größenordnungen) ist (Benos 1982).

Sowohl kompetitive als auch "mixed type" Hemmung von Amilorid wurden beschrieben. Kompetitive Hemmung mit einer K_i von 3.0×10^{-5} mol/l wurde für den Na^+/H^+-Austauscher aus Bürstensaummembranvesikeln der Kaninchenniere mit Hilfe der $^{22}Na^+$-Aufnahme gezeigt (Kinsella & Aronson 1981a). Der Hemmmechanismus bei Membranvesikeln aus der Ratenniere ist ebenfalls kompetitiv, wenngleich die K_i mit 2.8×10^{-4} mol/l um eine Zehnerpotenz höher liegt (Sabolić & Burckhardt 1984). Die letzteren Ergebnisse sind mit der pH-abhängigen AO-Aufnahme ermittelt worden. Ebenfalls mit dieser Methode fanden Ives et al. (1983a) bei Membranvesikeln aus der Kaninchennierenrinde eine "mixed type" Hemmung. Für den kompetitiven Anteil ist die Inhibitorkonstante $K_i = 3.0 \times 10^{-5}$ mol/l, für den nichtkompetitiven- $K'_i = 9.0 \times 10^{-5}$ mol/l. Da für Na^+ von den gleichen Autoren eine "mixed type" Hemmung durch Li^+ gezeigt wird, und außerdem die Li^+-abhängige Austauscheraktivität rein nichtkom-

petitiv gehemmt wird, nehmen die Autoren eine 2. modifizierende Bindungsstelle mit hoher Li^+-Affinität und geringerer Amiloridaffinität an. Die Diskrepanz zwischen diesen und den von Kinsella und Aronson (1981a,b) am gleichen Organ erhobenen Daten ist nicht mit den unterschiedlichen Testansätzen zu erklären. Wenn auch Interaktionen von Amilorid und AO bekannt sind (Sabolić & Burckhardt 1983b), lassen sich die durch Li^+ hervorgerufenen Effekte dadurch nicht erklären.

Auch auf den Na^+/H^+-Austauscher aus Kiemen von E. sinensis wirkt Amilorid durch eine "mixed type" Hemmung. Die Hemmkonstanten $K_i = 6.1 \times 10^{-5}$ mol/l und $K'_i = 1.37 \times 10^{-4}$ mol/l liegen im Bereich der in anderen Organen ermittelten halbmaximalen Hemmung (siehe Benos 1982). Diese geringe Affinität des Austauschers für Amilorid ist ein zusätzlicher Hinweis darauf, daß die hier beschriebene Aktivität auf den Na^+/H^+-Austauscher zurückzuführen und nicht durch parallele Leitfähigkeiten für Na^+ und H^+. Wenn Na^+-Kanäle beteiligt wären, müßte die Aktivität schon bei sehr viel niedrigeren Amiloridkonzentrationen gehemmt werden, da die bisher bekannten Na^+-Kanäle eine 2-3 Größenordungen höhere Affinität zu Amilorid haben. Auch eine Kompetition der Amiloridbindung durch Na^+ kann vernachlässigt werden, da die Na^+-Konzentration 75 mmol/l nicht übersteigt. Allerdings muß in Betracht gezogen werden, das die Eigenschaften von Na^+-Kanälen aus Epithelien der Crustaceen bisher unbekannt sind.

5.5 Physiologische Funktion der beiden charakterisierten Transportsysteme

Die (Na^+,K^+)-ATPase ist als primär-aktives Transportsystem im salztransportierenden Kiemenepithel der Crustaceen ursächlich am transepithelialen Transport beteiligt. Aktivitäten, wie sie in den posterioren Kiemen von Kurzschwanzkrebsen festgestellt werden, sind in dieser Höhe nur in wenigenanderen tierischen Geweben zu finden. Annähernd gleich hohe spezifische Aktivitäten der (Na^+,K^+)-ATPase werden nur in wenigen anderen ionentransportierenden Organen gemessen, wie z. B. der Vogelsalzdrüse, der Salzdrüse des Hais und des äußeren Marks der Säugetierniere. Die Lokalisation des Enzyms in der basolateralen Membran der Kiemenepithelzellen ist bisher nicht bewiesen, obwohl viele experimentelle Ergebnisse darauf hindeuten.

Die treibende Kraft für die Aufnahme von Na^+ und zum Teil auch von Cl^- durch das Kiemenepithel wird durch die (Na^+,K^+)-ATPase generiert. Der Na^+-Nettoinflux ist vollständig von der ATPase abhängig. Die (Na^+,K^+)-ATPase in der basolateralen Membran pumpt Na^+ aus der Zelle in den Hämolymphraum, um somit einen elektrochemischen Gradienten von außen nach innen für Na^+ aufzubauen. Der Na^+-Einstrom über apikal lokolisierte Transportsysteme wird so ermöglicht. Insgesamt ergibt sich durch diese Koppelung von primär-aktivem und sekundär-aktivem Transport ein transepithelialer Na^+-Strom. Als limitierender Faktor für die Aktivität der (Na^+,K^+)-ATPase ist primär die intrazelluläre Na^+-Konzentration zu sehen, da sie wahrscheinlich im Bereich des K_a's für Na^+ liegt (genaue Daten über die intrazelluläre Na^+-Konzentation des Kiemenepithels existieren nicht). K^+ ist in der Hämolymphe der Crustaceen ausreichend vorhanden (10-20 mmol/l, siehe Mantel & Farmer 1983), sodaß hierdurch die (Na^+,K^+)-ATPase optimal arbeiten kann. Daraus ergibt sich die Hypothese, daß die Regulation des Na^+-Einstroms sinnvollerweise an den apikalen Transportsystemen ansetzen sollte.

Der durch diese Arbeit erstmalig in Zellmembranen aus dem Kiemenepithel nachgewiesene Na^+/H^+-Austauscher könnte zumin-

dest zum Teil für den apikalen Na^+-Einstrom verantwortlich sein, zumal der Na^+-Influx perfundierter Kiemen eine sehr ähnliche Kinetik hat (Pequeux & Gilles 1981). Ein oder mehrere weiterere Wege für Na^+ sind allerdings wahrscheinlich, weil durch den elektroneutralen Austausch von Na^+ und H^+ allein das badseitig positive transepitheliale Potential (siehe 4.4.5) nicht erklärbar ist. Die physiologische Bedeutung des Na^+/H^+-Austauschers bezieht sich wahrscheinlich primär auf die Regulation des Säure-Basenhaushalts, weniger auf die Ionenregulation. Diese Funktion kann der Na^+/H^+-Austauscher allerdings nur übernehmen, wenn er in der apikalen Zellmembran der Epithelzellen lokalisiert ist. In welcher der beiden Zellmembranbereiche er zu finden ist, läßt sich allerdings nicht mit Sicherheit bestimmen, da sie nicht voneinander getrennt werden konnten.

Ein gemeinsames Vorkommen der (Na^+,K^+)-ATPase und des Na^+/H^+-Austauschers in der basolateralen Membran ist allerdings durch einen speziellen Testansatz auszuschließen. Ein unter Anwesenheit von Acridinorange durchgeführter (Na^+,K^+)-ATPase Test führt zu keiner Fluoreszenzunterdrückung. Inside-out orientierte Vesikel, die (Na^+,K^+)-ATPase enthalten, akkumulieren unter diesen Bedingungen Na^+. Ein in den selben Vesikeln enthaltener Na^+/H^+-Austauscher würde dieses Na^+ gegen H^+ austauschen und somit eine Fluoreszenzabnahme hervorrufen.

Für die asymmetrische Verteilung von (Na^+,K^+)-ATPase und Na^+/H^+-Austauscher in den Epithelzellen sprechen auch neueste Ergebnisse an Kiemen von U. tangeri (Krippeit pers. Mittlg.). Isolierte Kiemen säuern ihr Umgebungsmedium an. Die Ansäuerung wird vollständig verhindert, wenn 10^{-2} mol/l Ouabain von innen gegeben wird. Auch in Zellmembranvesikeln dieser Kiemen ist eine Na^+/H^+-Austauscher Aktivität meßbar (Ergebnisse nicht dargestellt).

Abschließend läßt sich die These aufstellen, daß die in den Kiemen stattfindende Säure-Basenregulation der Crustaceen durch die Protonensekretion des Na^+/H^+-Austauschers betrieben wird. Dieser sekundär-aktive Prozess wird durch die (Na^+,K^+)-ATPase angetrieben.

6. Zusammenfassung

Die posterioren Kiemen von E. sinensis sind wie bei anderen Kurzschwanzkrebsen an der Ionen- und Säure-Basenregulation beteiligt. Na^+-Absorption und Säureexkretion finden über das Kiemenepithel statt.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Transportsysteme, die an diesen Prozessen beteiligt sind, biochemisch charakterisiert:

- Eine Methode zur Aktivierung der (Na^+,K^+)-ATPase mit SDS wird vorgestellt. Durch die Aktivierung kann auch die in geschlossenen Membranvesikeln "latent" vorkommende (Na^+,K^+)-ATPase sicher bestimmt werden.

- Die Isolierung von Zellmembranen aus dem Kiemenepithel wird gezeigt. Basolaterale Membranen werden bis zu 9-fach, apikale Membranen bis zu 5.5-fach in einer gemeinsamen Fraktion angereichert. Die Isolierung der einzelnen Membranbereiche mit Methoden, wie sie bei transportierenden Epithelien der Säugetiere verwendet werden, ist nicht möglich.

- Die Charakterisierung der (Na^+,K^+)-ATPase der isolierten Zellmembranen wird beschrieben.

- Die scheinbare K_m für das Substrat Mg-ATP ist 2.3×10^{-4} mol/l.

- Freies Mg_f aktiviert die (Na^+,K^+)-ATPase.

- Na^+ und K^+ aktivieren das Enzym. Die scheinbare Aktivatorbindungskonstante $K_{a,app}$ für Na^+ liegt bei 14 mmol/l, die für K^+ bei 0.9 mmol/l.

- Ouabain hemmt die (Na^+,K^+)-ATPase. Die halbmaximale Hemmung liegt bei 7.9×10^{-5} mol/l.

- Der Arrhenius-Plot der (Na^+,K^+)-ATPase-Aktivität zeigt eine Diskontinuität. Die Knickpunkttemperatur T_c ist 20.4°C.

- Mit Hilfe der pH-abhängigen Aufnahme von Acridinorange wird der Na^+/H^+-Austauscher den Zellmembranvesikeln nachgewiesen.

- Die Aktivität des Na^+/H^+-Austauschers ist Na^+-abhängig. Die maximale Aktivität wird um 75 mmol/l Na^+ erreicht. Die $K_{0.5}$ liegt bei 16.6 mmol/l Na^+.

- Der Na^+/H^+-Austauscher wird durch Amilorid gehemmt. Eine "mixed type" Hemmung wird festgestellt.

- Zwei Inhibitorkonstanten mit $K_i = 6.1 \times 10^{-5}$ mol/l und $K'_i = 1.4 \times 10^{-4}$ mol/l sind nachzuweisen.

Die physiologische Funktion beider Transportsysteme wird diskutiert, und ein Modell über die Lokalisation und das Zusammenwirken beider Systeme in der Kiemenepithelzelle vorgestellt.

7. Literatur

Ahearn,G.A.; Maginniss,L.A.; Song,Y.K.; Tornquist,A. (1977)
Intestinal water and ion transport in freshwater malacostracan prawns (crustacea). In: water relations in Membrane transport in Plants and Animals.
Eds.: Jungreis,A.; Hidges,T.; Kleinzeller,A.; Schultz,S.,
Academic Press, New York

Anmer,B.A.; Lane,L.K.; Schwarz,A.; Pitts,B.J.R. (1977)
A reconstituted Na^++K^+ pump in liposomes containing purified (Na^+,K^+) ATPase from kidney medulla.
Biochim. Biophys. Acta **467** 340

Aronson,P.S. (1981)
Identifying secondary active solute transport in epithelia.
Am. J. Physiol. **240** F1

Aronson,P.S. (1983)
Mechanisms of active H^+ secretion in the proximal tubule.
Am. J. Physiol. **245** F647

Aronson,P.S. (1985)
Kinetic properties of the plasma membrane Na^+-H^+ exchanger.
Ann. Rev. Physiol. **47** 545

Aronson,P.S.; Suhm,M.A.; Nee,J. (1983)
Interaction of external H^+ with the Na^+-H^+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles.
J. Biol. Chem. **258** 6767

Atkinson,A.; Gatenby,A.D.; Lowe,A.G. (1971)
Subunit structure of the Na, K-dependent transport ATPase.
Nature 233 145

Barra,J.A.; Pequeux,A.; Humbert,W. (1983)
A morphological study on gills of a crab acclimated to freshwater.
Tissue and cell 15 (4) 583

Benos,D.J. (1982)
Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells.
Am. J. Physiol. 242 C131

Bielawski,J. (1964)
Chloride transport and water intake into isolated gills of crayfish.
Comp. Biochem. Physiol. 13 423

Bonting,S.L.; Swarts,H.G.P.; Schuurmans Stekhoven,F.M.A.H.; De Pont, J.J.H.H.M. (1983)
Magnesium-induced conformational changes in Na,K-ATPase.
Curr. T. Membr. Trans. 19 403

Bonting,S.L. (1970)
Sodium-potassium activated adenosinetriphosphatase and cation transport. In: Membranes and ion transport.
Ed.: Bittar,E.E., John Wiley and Sons Ltd., London, New York

Booth,A.G.; Kenny,A.J.; (1974)
A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney.
Biochem. J. 142 575

Bradford,M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72 248

Cala,P.M. (1980)
Volume regulation by amphiuma red blood cells. The membrane potential and its implication regarding the nature of ion-flux pathways.
J. Gen. Physiol. 76 683

Caldwell,P.C.; Keynes,R.D. (1959)
The effect of ouabain on the efflux of sodium from a squid giant axon.
J. Physiol. London 148 8P

Cameron,J.N.; Heisler,N. (1983)
Studies of ammonia in the rainbow trout: physico-chemical parameters, acid-base behaviour and resriratory clearence.
J. exp. Biol. 105 107

Cavalli-Sforza,L. (1974)
Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart

Charnock,J.S.; Bashford,C.L. (1975)
A fluorescent probe study of the lipid mobility of membranes containing sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase.
Mol. Pharmacol. 11 766

Clark,B.; Porteous,J.W. (1964)
Determination of succinic acid by an enzymic method.
Biochem. J. 93 21c

Conklin,R; Krogh,A. (1938)
A note on osmotic behaviour of Eriocheir in concentrated and Mytilus in dilute sea water.
Z. vergl. Physiol. 26 239

Copeland,D.E. (1967)
A study of salt secreting cells in the brine shrimp (Artemia salina).
Protoplasma 63 363

Copeland,D.E.; Fitzjarrell,A.T. (1968)
The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (Calinectes sapidus, Rathburn) with notes on modified mitochondria.
Z. Zellforsch. 92 1

Crane,R.K. (1977)
The gradient hypoththesis and other models of carier-mediated active transport.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 78 99

Croghan,P.C. (1958a)
The mechanism of osmotic and ionic regulation in Artemia salina (L).: The physiology of the gut.
J. exp. Biol. 35 243

Croghan,P.C. (1958b)
The mechanism of osmotic and ionic regulation in Artemia salina (L).: The physiology of the branchiae.
J. exp. Biol. 35 234

Croghan,P.C.; Curra,R.A.; Lockwood,A.P.M. (1965)
The potential difference across the epithilium of isolated gills of the crayfish Austropotamobius pallipes (Lereboullet).
J. exp. Biol. 42 463

D'Orazio,S.E.; Holliday,C.W. (1985)
Gill Na,K-ATPase and osmoregulation in the sand fiddler crab, Uca pugilator.
Physiol. Zool. 58 (4) 364

Dahl,J.J.; Hokin,L.E. (1974)
The sodium-potassium adenosinetriphosphatase.
Ann. Rev. Biochem. 43 327

Dall,W. (1964)
Hypo-osmoregulation in Crustacea.
Comp. Biochem. Physiol. 21 653

Deamer,D.W.; Prince,R.C.; Crofts,A.R. (1971)
The response of fluorescent amines to pH gradients across liposome membranes.
Biochim. Biophys. Acta 274 323

Dehnel,P.A. (1974)
Gill tissue respiration in the crab Eriocheir sinensis.
Can. J. Zool. 52 923

DiBona,D.; Mills,J. (1979)
Distribution of Na^+-Pump sites in transporting epithelia.
Fed. Proc. 38 207

Dixon,M.; Webb,E.C. (1979)
Enzymes.
3rd edit. Longman Group Ltd., London

Drews,G. (1982)
Beteiligung der einzelnen Kiemen der euryhalinen Winkerkrabbe Uca pugilator (Bosc, 1802) an der extrazellulären Osmoregulation.
Diplomarbeit FU-Berlin

Drews,G. (1985)
Elektrophysiologische und biochemische Untersuchungen zur osmoregulatorischen Fähigkeit und Salzaufnahme über das Kiemenepithel von Uca tangeri (Eydoux 1835).
Dissertation FU Berlin

Drews,G; Graszinsky,K; Teller,C. (1981)
Osmoregulation in the euryhaline fiddler crab Uca pugilator: Participation of the individual gills.
3rd congress of the ESCPB, Noordwijkerhout, Book of Abstracts 179

Drews,G; Graszynski,K. (1984)
Studies on transepithelial potential difference of isolated perfused gills of the fiddler crab Uca tangeri: Methods and first results.
1. Congress of Comp. Physiol. Biochem. Book of Abstracts B 141

Ehrenfeld,J. (1974)
Aspects of ionic transport mechanisms in crayfish Astacus leptodactylus.
J. exp. Biol. 61 57

Erdmann,E.; Schoner,W. (1974)
Ouabain receptor interactions in $(Na^+ + K^+)$-ATPase preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steriods and other substances and their affinity to the glycoside receptor.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283 335

Ernst,S.A.; Mills,J. (1980)
Autoradiographic localisation of tritiated ouabain.sensitive sodium pump sites in ion transporting epithelia.
J. Histochem. Cytochem. 28 72

Evers,C.; Haase,W.; Murer,H.; Kinne,R. (1978)
Properties of brush border vesicles isolated from rat kidney cortex by calcium percipitation.
Membr. Biochem. 1 203

Fahn,S.; Koval,G.J.; Albers,R.W. (1966)
Sodium and potassium activated adenosine triphosphatase of Electrophorus elctric organ. I. An associated sodium-activated transphosphorylation.
J. Biol. Chem. 241 1882

Forbush III,B. (1983a)
Assay of Na,K-ATPase in plasma membrane preparations: Increasing the permeability of membrane vesicles using sodium dodecylsulfate buffered with bovine serum albumin.
Anal. Biochem. 128 159

Forbush III,B. (1983b)
Native membranes from kidney outer medulla, enriched in Na,K-ATPase and vesicular nature.
Curr. T. Membr. Trans. 19 113

Frelin,C.; Vigne,P.; Lazdunski,M. (1983)
The amiloride-sensitive Na^+/H^+ antiport in 3T3 fibroblasts.
J. Biol. Chem. 258 6272

Garay,R.P.; Garrahan,P.J. (1973)
The interaction of sodium and potassium with the sodium pump in red cells.
J. Physiol, London 231 297

Garrahan,P.J.; Glynn,I.M. (1967)
The stoichiometry of the sodium pump.
J. Physiol. London 192 217

Garrahan,P.J.; Rossi,R.C.; Rega,A.F. (1982)
The interaction of K^+, Na^+, Mg^{2+} and ATP with the (Na,K) -ATPase.
Ann. New York Ac. Sci. 402 239

Glynn,I.M. (1961)
Activation of adenosine triphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium.
J. Physiol. London 160 18P

Glynn,I.M.; Karlish,S.J.D. (1975)
The sodium pump.
Ann. Rev. Physiol. 37 13

Goldin,S.M. (1977)
Active transport of sodium and potassium ions by the sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from renal medulla. Reconstitution of the purified enzyme into a well defined in vitro transport system.
J. Biol. Chem. 252 5630

Graszynski,K; Unverzagt,S.; Bigalke,T. (1979)
Strategies of osmoregulation in the fiddler crab Uca pugilator: Biochemical changes in the membranes of the gills and alterations in the concentration of sodium in the hemolymph.
1. Conference of ESCPB, Book of Abstracts, Ed.: Gilles,R. Pergamon Press, Oxford, New York.

Green,J.D.; Narahara,H.T. (1980)
Assay of succinate dehydrogenase activity by the tetrazolium method: Evaluation of an improved technique in skeletal muscle fraction.
J. Histochem. Cytochem. 28 408

Green,W.J.; Harsch,M.; Barr,L.; Prosser,L. (1959)
The regulation of water and salt by the fiddler crabs, Uca pugnax and Uca pugilator.
Biol. Bull. 116 76

Grinstein,S.; Clarke,C.A.; Rothstein,A. (1983)
Activation of Na^+/H^+ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification.
J. Gen. Physiol. 82 619

Gross,W.J. (1964)
Water balance in anomuran land crabs on a dry atoll.
Biol. Bull. 126 54

Hansen,O. (1974)
The influence of monovalent cations and Ca^{2+} on g-strophantin binding to $(Na^+ + K^+)$-activated ATPase.
Ann. New York Ac. Sci. 242 635

Hansen,O.; Jensen,J.; Nørby,J.G. (1971)
Mutual exclusion of ATP, ADP and g-strophantin binding to NaK-ATPase.
Nature 234 122

Hays,R.M.; Barland,P. (1966)
The isolation of the membrane of the toad bladder epithelial cell.
J. Cell. Biol. 31 209

Hegyvary,C.; Post,R.L. (1971)
Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 246 5234

Heidrich.H.-G.; Kinne.R.; Kinne-Saffran,E.; Hannig,K. (1972)
The polarity of the proximal tubule cell in rat kidney. Different surface charge for the brush-border microvilli and plasma membranes from the basal infoldings.
J. Cell Biol. 54 232

Henry,R.J.; Cameron,J.N. (1982)
Acid-base balance in Callinectes sapidus acclimation from high to low salinity.
J. exp. Biol. 101 255

Hexum,T.; Samson,F.E.; Himes,R.H. (1970)
Kinetic studies of membrane (Na^+-K^+-Mg^{2+})-ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 212 322

Hilden, S.; Hokin,L. (1976)
Coupled Na^+-K^+ transport in vesicles containing a purified (NaK)-ATPase and only phosphatidylcholine.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 69 No. 2 521

Hoffman.J.F. (1966)
The red cell mebrane and the transport of sodium and potassium.
Am. J. Med. 41 666

Holliday,C.W. (1985)
Salinity-induced changes in gill Na,K-ATPase activity in the mud fiddler crab, Uca pugnax.
J. exp. Zool. 233 199

Horiuchi,S. (1977)
Characterization of gill Na,K-ATPase in the freshwater crayfish, Procambarus clarki (Girard).
Comp. Biochem. Physiol. 56B 135

Inui,K.; Okano,T.; Takano,M.; Kitazawa,S.; Hori,R.; (1981)
A simple method for isolation of basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney cortex.
Biochim. Biophys. Acta 647 150

Jørgensen,P.L.; (1974a)
Purification and characterization of (Na^+,K^+)-ATPase III. Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dodecylsulfate.
Biochim. Biophys. Acta 356 36

Jørgensen,P.L. (1974b)
Purification and characterization of $(Na^+ + K^+)$-ATPase. IV. Estimation of the purity and of the molecular weight and polypeptide content per enzyme unit in prparations from the outer medulla of rabbit kidney.
Biochim. Biophys. Acta 356 53

Jørgensen,P.L.; Skou,J.C. (1971)
Purification and characterization of $(Na^+ + K^+)$-ATPase. I. The influence of detergents on the activity of $(Na^+ + K^+)$-ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney.
Biochim. Biophys. Acta 233 3

Jones,L.L. (1941)
Osmotic regulation in several crabs of the pacific coast of North America.
J. cell. comp. Physiol. 18 79

Karlish,S.J.D.; Yates,D.W.; Glynn,I.M. (1978)
Elementary steps of the $(Na^+ + K^+)$-ATPase mechanism, studied with formycin nucleotides.
Biochim. Biophys. Acta 525 230

Kimelberg,H.K.; Papahadjopoulos,D. (1974)
Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transition, and cholesterol on (Na^++K^+)-stimulated adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 249 1071

King,E.N.; Schoffeniels,E. (1969)
'In vitro' preparation of crab gill for use in ion transport studies.
Arch. Int. Physiol. Biochim. 77 105

Kinsella,J.L.; Aronson,P.S. (1981a)
Amiloride inhibition of the Na^+-H^+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles.
Am. J. Physiol. 241 F374

Kinsella,J.L.; Aronson,P.S. (1981b)
Interaction of NH_4^+ and Li^+ with the renal microvillus membrane Na^+-H^+ exchanger.
Am. J. Physiol. 241 C220

Kinsella,J.L.; Aronson,P.S. (1982)
Determination of the coupling ratio for Na^+-H^+ exchange in renal microvillus membrane vesicles.
Biochim. Biophys. Acta 689 161

Kinsella.J.L.; Aronson,P.S. (1980)
Properties of the Na^+-H^+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles.
Am. J. Physiol. 238 F461

Kirschner,L.B. (1979)
Control mechanisms in crustaceans and fishes. In: Mechanisms of osmoregulation in animals.
Ed.: Gilles,R., John Wiley and Sons Ltd., Chichester, New York

Kirschner,L.B.; Greenwald,L.; Kerstetter,T.H. (1973)
Effect of amiloride on sodium transport across body surfaces of freshwater animals.
Am. J. Physiol. 244(4) 832

Koch,H.J. (1934)
Essai d'interpretation de la soi-disant 'reduction vitale' de sels d'argent par certains d'arthropodes.
Ann. Soc. Scient. Bruxelles B 54 346

Koch,H.J.; Evans,J.; Schicks,E. (1954)
The active absorption of ions by isolated gills of the crab Eriocheir sinensis (M. Edw.).
Meded. vlaamsche Acad. Kl. Wet. 16 1

Kormanik,G.A.; Cameron,J.N. (1981)
Ammonia excretion in the seawater blue crab (callinectes sapidus) occurs by diffusion, and not Na^+/NH_4^+ exchange.
J. Comp. Physiol. 141B 457

Krogh,A. (1938)
The active absorption of ions in some freshwater animals.
Z. vergl. Physiol. 25 335

Lee,H.C. (1985)
The voltage-sensitive Na^+/H^+ exchange in sea urchin spermatozoa flagellar membrane vesicles studied with an entrapped pH probe.
J. Biol. Chem. 260 10974

Lee,H.C.; Forte,J.G. (1978)
A study of H^+ transport in gastric microsome vesicles using fluorescent probes.
Biochim. Biophys. Acta 508 339

Lerner,J. (1985)
Effectors of amino acid transport processes in animal cell membranes.
Comp. Biochem. Physiol. 81A 713

Levitt,D.G. (1980)
The mechanism of the sodium pump.
Biochim. Biophys. Acta 604 321

Lockwood,A.P.M. (1977)
Transport and osmoregulation in crustacea. In: Transport of ions and water in animals.
Eds.: Gupta,B.L.; Moreton,R.B.; Oschmann,J.L.; Wall,B.J., Academic Press, London

Lockwood,A.P.M.; Inman,C.B.E.; Courtnay,T.H. (1973)
The influence of environmental salinity on the water fluxes of the amphipod crustacean Gammarus duebeni.
J. exp. Biol. 58 137

Maetz,J. (1974)
Aspects of adaptation to hypo-osmotic and hyper-osmotic environments. In: Biochemical and biophysical perspectives in marine biology.
Eds.: Malins,D.C.; Sargent,J.R., Academic Press, London, 1 1

Magnum,C.P.; Silverthorn,S.U.; Harris,J.L.; Towle,D.W.; Krall,A.R. (1976)
The relationship between blood pH, ammonia secretion and adaptation to low salinity in the blue crab Callinectes sapidus.
J. exp. Zool. 195 129

Mantel,L.H. (1967)
Asymmetry potentials, metabolism and sodium fluxes in gills of the blue crab, Calinectes sapidus.
Comp. Biochem. Physiol. 20 743

Mantel,L.H.; Farmer,L.L. (1983)
Osmotic and ionic regulation. In: The biology of crustacea. Vol. 5, Academic Press, London

Mantel,L.H.; Landesman,J. (1977)
Osmotic regulation and Na^+,K^+-activated ATPase in the green crab Carcinus maenas and the spider crab Libinia emarginata.
Biol. Bull. 153 437

Mantel,L.H.; Olson,J.R. (1976)
Studies on the Na^+-K^+ activated ATPase of crab gills.
Am. Zool. 16 223

Matsui,H.; Schwartz,A. (1966)
Purification and properties of highly active ouabain-sensitive Na^+, K^+-dependent adenosine triphosphatase from cardiac tissue.
Biochim. Biophys. Acta 128 380

McDanough Spencer,A.; Fielding,A.H.; Kamemoto,F. (1979)
The relationship between gill NaK-ATPase activity and osmoregulatory capacity in various crabs.
Physiol. Zool. 52 1

Milne,D.J.; Ellis,R.A. (1973)
The effect of salinity acclimation on the ultra structure of the gills of Gammarus oceanicus (Segerstrale, 1947) (Crustacea: Amphipoda).
Z. Zellforsch. 139 311

Moolenaar,W.H.; Mummery,C.L.; Van der Saag,P.T.; De Laat,S.W. (1981)
Rapid ionic events and the initiation of growth in serum-stimulated neuroblastoma cells.
Cell 23 789

Morse,H.C.; Harris,P.J.; Dornfeld,E.J. (1970)
Pacifastacus leniusculus: fine structure of arthrobranch with reference to active ion uptake.
Trans. Am. Microsc. Soc. 89 12

Murer,H.; Ahearn,G.; Biber,J.; Cassano,G.; Gmaj,P.; Stieger,B. (1983)
Co- and counter-transport mechanisms in brush border membranes and basal-lateral membranes of intestine and kidney.
J. exp. Biol. 106 163

Murer,H.; Burckhardt,G. (1983)
Membrane transport of anions across epithelia of mammalian small intestine and kidney proximal tubule.
Rev. Physiol. Biochem. 96 1

Murer,H.; Hopfer,U.; Kinne,R. (1976)
Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney.
Biochem. J. 154 597

Murer,H.; Kinne,R. (1980)
The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes.
J. Membr. Biol. 55 81

Mykles,D.L. (1981)
Ionic requirements of transepithelial potential difference and net water flux in the perfused midgut of the American lobster, Homarus americanus.
Comp. Biochem. Physiol. 69A 317

Nagel,H. (1934)
Die Aufgaben der Exkretionsorgane und Kiemen bei der Osmoregulation von carcinus maenas.
Z. vergl. Physiol. 21 468

Neufeld,G.J.; Holliday,C.W.; Pritchard,J.B. (1980)
Salinity adaption of gill Na,K-ATPase in the blue crab, Callinectes sapidus.
J. exp. Zool. 211 215

Neufeld,G.J.; Pritchard,J.B. (1978)
Gill Na,K-ATPase and osmoregulation in two species of shore crab.
Fed. Proc. 37 623

Nørby,J.G. (1983)
Ligand interactions with the substrate site of Na,K-ATPase: nucleotides, vanadate, and phosphorylation.
Curr. T. Membr. Trans. 19 281

Nørby,J.G.; Jensen,J. (1971)
Binding of ATP to brain microsomal ATPase. Determination of the ATP-binding capacity and the dissociation constant of the enzyme-ATP complex as a function of K^+ concentration.
Biochim. Biophys. Acta 233 104

Novikoff,A.B.; Heus,M. (1963)
A microsomal nucleoside diphophatase.
J. Biol. Chem. 238 710

Ohnishi,T.; Gall,R.S.; Mayer,M.L. (1975)
An improved assay of inorganic phosphate in the presence of extralabile phosphate compounds: application to the ATPase assay in the presence of phosphocreatine.
Anal. Biochem. 69 261

Pennington,R.J. (1961)
Biochemistry of dystrophic muscle; mitochondrial succinate-tetrazolium reductase and adenosine triphosphatase.
Biochem. J. 80 649

Pequeux,A.; Chapelle,S.; Wanson,S.; Goffinet,G.; Francois,C. (1983)
(Na^+-K^+)ATPase activity and phospholipid content of various fractions of the posterior gills of Carcinus maenas and Eriocheir sinensis.
Mar. Biol. Lett. 4 267

Pequeux,A.; Gilles,R. (1981)
Na^+ fluxes across isolated perfused gills of the chinese crab Eriocheir sinensis.
J. exp. Biol. 92 173

Pequeux,A.J.R.; Gilles,R. (1984)
Control of the extracellular fluid osmolality in Crustaceans.
In: Osmoregulation in Estuarine and Marine Animals.
Eds.: Pequeux,A.; Gilles,R.; Bolis,L. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo

Pequeux,A; Gilles,R. (1978)
Osmoregulation of the euryhaline chinese crab, Eriocheir sinensis. Ionic transport across isolated perfused gill as related to the salinity of the environment.
Proc. Symp. Mar. Biol. 12 105.

Peter,H.W.; Wolf,H.U. (1972)
Kinetics of (Na^+,K^+)-ATPase of human erythrocyte membranes. I. Activation by Na^+ and K^+.
Biochim. Biophys. Acta 290 300

Peterson,G.L.; Hokin,L.E. (1980)
Improved purification of brine-shrimp (Artemia salina) (Na^++K^+)-activated adenosine triphosphatase and amino-acid and carbohydrate analyses of the isolated subunits.
Biochem. J. 192 107

Post,R.L.; Kume,S.; Tobin,T.; Orcutt,B.; Sen,A.K. (1969)
Flexibility of an active center in sodium plus potassium adenosine triphosphatase.
J. Gen. Physiol. 54 306s

Pressley,T.A.; Graves,J.S.; Krall,A.R. (1981)
Amiloride-sensitive ammonium and sodium ion transport in the blue crab.
Am. J. Physiol. 241 R370

Quinn,D,J,; Lane,C.E. (1966)
Ionic regulation and Na^+,K^+-stimulated ATPase activity in the land crab Cardiosoma guanhumi.
Comp. Biochem. Physiol. 19 533

Rabon,E.; Chang,H.; Sachs,G. (1978)
Quantitation of hydrogen ion and potential gradients in gastric plasma membrane vesicles.
Biochemistry 17 3345

Racker,E.; Fisher,L.W. (1975)
Reconstitution of an ATP-dependent sodium pump with an ATPase from electric eel and pure phospholipids.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 67 1144

Radford,E.P. (1964)
The physics of gases. In: Handbook of physiology
Section 3, I, Eds.: Fenn,W.O.; Rahn,H., Am. Physiol. Soc.,
Washington

Reenstra,W.W.; Warnock,D.G.; Yee,V.J.; Forte,J.G. (1981)
Proton gradients in renal cortex brush-border membrane
vesicles. Demonstration of a rheogenic proton flux with
acridine orange.
J. Biol. Chem. 256 11663

Rindler,M.J.; Saier,M.H.Jr. (1981)
Evidence for Na^+/H^+ antiport in cultured dog kidney cells (MDCK).
J. Biol. Chem. 256 10820

Robinson,J.D. (1972)
Divalent cations as allosteric modifiers of the $(Na^+ + K^+)$-
dependent ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 266 97

Robinson,J.D. (1974a)
Nucleotide and divalent cation interactions with the
$(Na^+ + K^+)$-dependent ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 341 231

Robinson,J.D. (1974b)
Free Mg^{2+} and proposed isomerizations of the $(Na^+ + K^+)$-
dependent ATPase.
Febs Letters 47 No.2 352

Robinson,J.D. (1976)
Substrate sites of the $(Na^+ + K^+)$-dependent ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 429 1006

Rothenberg,P; Glaser,L.; Schlesinger,P.; Cassel,D. (1983)
Epidermal growth factor stimulates amilorid-sensitive ^{22}Na uptake in A431 cells.
J. Biol. Chem. 258 4883

Sabolić,I; Burckhardt,G. (1983a)
Proton pathways in rat renal brush-border and basolateral membranes.
Biochim. Biophys. Acta 734 210

Sabolić,I; Burckhardt,G. (1983b)
Apparent inhibition of Na^+/H^+ exchange by amiloride and harmaline in acridine orange studies.
Biochim. Biophys. Acta 731 354

Sabolić,I.; Burchhardt,G. (1984)
Effeect of the preparation method on Na^+-H^+ exchange and ion permeabilities in rat renal brush-border membranes.
Biochim. Biophys. Acta 772 140

Sachs,J.R.; Welt,L.G. (1967)
The concentration dependence of active K transport in the human red blood cell.
J. Clin. Invest. 46 65

Sall,I.; Ferard,G.; Metais,P. (1975)
L'adenosine triphosphatase (Na^++K^+)dependante de l'entestine grèle: determination et proprietes chez le rat.
Ann. Biol. Clin. 33 81

Scalera,V.; Huang,Y.; Hildmann,B.; Murer,H.; (1981)
A simple isolation method for baso-lateral plasma membranes from rat kidney cortex.
Membr. Biochem. 4 49

Scalera,V.; Storelli,C.; Storelli-Joss,Ch.; Haase,W.; Murer,H. (1980)
A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small-intestinal epithelial cells.
Biochem. J. 180 177

Schlieper,C. (1929)
Die Osmoregulation der Süßwasserkrebse
Verh. dtsch. zool. Ges. 33 437

Schoner,W.; von Ilberg,C.; Kramer,R.; Seubert,W. (1967)
On the mechanism of Na^+ and K^+ stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate. 1. Purification and properties of a Na^+ and K^+-activated ATPase from ox brain.
Eur. J. Biochem. 1 334

Schuldiner,S.; Rottenberg,H.; Avron,M. (1971)
Determination of Delta pH in chloroplasts. 2. Fluorescent amines as a probe for the determination of Delta pH in chloroplasts.
Eur. J. Biochem. 25 64

Schuurmans Stekhoven,F.; Bonting,S.L. (1981)
Transport adenosine triphosphatase: Properties and functions.
Physiol. Rev. 61 1

Schuurmans Stekhoven,F.M.A.H.; Swarts,H.G.P.; De Pont,J.J.H.H.M.; Bonting,S.L. (1981)
Studies on $(Na^+ + K^+)$-activated ATPase. XLV. Magnesium induces two low-affinity non-phosphorylating nucleotide binding sites per molecule.
Biochim. Biophys. Acta 649 533

Scott,W.N.; Yang,C-P.H.; Reich,I.M.; Kinne-Saffran,E.; Kinne,R. (1983)
Separation of apical and baso-lateral components of plasma membrane of toad bladder mucosal cells.
Fed. Proc. 42 2171

Sedmak,J.J.; Grossberg,S.I. (1977)
A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250.
Anal. Biochem. 79 544

Seifter,J.; Kinsella,J.L.; Aronson,P.S. (1981)
Mechanism of Cl transport in Necturus renal microvillus membrane vesicles.
Kidney Int. 19 257

Seiler,S.M.; Cragoe,E.J.Jr.; Jones,L.R. (1985)
Demonstration of a Na^+/H^+ exchange in purified canine cardiac sarcolemmal vesicles.
J. Biol. Chem. 260 4869

Sen,A.K.; Post,R,L. (1964)
Stoichiometry and lokalisation of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte.
J. Biol. Chem. 239 345

Sen,A.K.; Tobin,T.; Post,R.L. (1969)
A cycle for ouabain inhibition of sodium and potassium adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem. 244 6596

Shamoo,A.E.; Brodsky,W.A. (1972)
Functions of the E-ATP and E-P complexes in the membrane ATPase reaction.
Biochim. Biopys. Acta 255 220

Shamoo,A.E.; Meyers,M. (1974)
Na^+-dependent ionophore as part of the small polypeptide of the $(Na^+ + K^+)$-ATPase from eel electroplax membrane.
J. Membr. Biol. 19 163

Sheikh,M.I.; Kragh-Hansen,U.; Jørgensen,K.E.; Røigaard-Petersen,H.; (1982)
An efficient method for isolation and separation of basolateral-membrane and luminal-membrane vesicles from rabbit kidney cortex.
Biochem. J. 208 377

Siebers,D.; Leweck,K.; Markus,H.; Winkler,A. (1982)
Sodium regulation in the shore crab Carcinus maenas as related to ambient salinity.
Mar. Biol. 69 37

Siebers,D.; Winkler,A.; Leweck,K.; Madian,A. (1983)
Regulation of sodium in the shore crab carcinus meanas, adapted to environments of constant and changing salinities.
Helgoländer wiss. Meeresunters. 36 303

Siebers,D.; Winkler,A.; Lucu,C.; Thedens,G.; Weichart,D. (1985)
Na-K-ATPase generates an active transport potential in the gills of hyperregulating shore crab Carcinus maenas.
Mar. Biol. 87 185

Siebers,D; Winkler,A. (1985)
Aktive Aufnahme von NaCl in den Kiemen der Strandkrabbe Carcinus maenas.
Abstract der Tagung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Nauheim 13

Siegel,G.J.; Albers,R.W. (1967)
Sodium and potassium activated adenosine triphosphatase of Electrophorus electric organ. IV. Modification of responses to sodium and potassium by arsenite plus 2,3-dimercaptopropanol.
J. Biol. Chem. **242** 4972

Singh,A.P.; Bragg,P.D (1977)
ATP-dependent proton translocation and quenching of 9-aminoacridine fluorescence in inside out membrane vesicles of a cytochrome-deficient mutant of Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta **464** 562

Skou,J.C. (1957)
The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.
Biochim. Biophys. Acta **23** 394

Skou,J.C. (1965)
Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membranes.
Physiol. Rev. **45** 596

Skou,J.C. (1974)
Effects of ATP on the intermediary steps of the reaction of the $(Na^+ + K^+)$-dependent enzyme system. II. Effekt of a variation in the ATP/Mg^{2+} ratio.
Biochim. Biophys. Acta **339** 246

Skou,J.C. (1979)
Effects of ATP on the intermediary steps of the reaction of the $(Na^+ + K^+)$-ATPase. IV. Effect of ATP an $K_{0.5}$ for Na^+ and on hydrolysis at different pH and temperature.
Biochim. Biophys. Acta 567 421

Stern,S.; Borut,A.; Cohen,D. (1984)
Characterization of Na-K ATPase from the gills of the freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii (De Man).
Comp. Biochem. Physiol. 79B 47

Sweadner,K.J.; Goldin,S.M. (1975)
Reconstitution of active ion transport by the sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase of canine brain.
J. Biol. Chem. 250 4022

Taniguchi,R.; Iida,S. (1972)
The effect of phospholipids on thr apparent activation energy of $(Na^+ - K^+)$-ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 274 536

Tobin,T.; Akera,T.; Baskin.S.I.; Brody,T.M. (1973)
Calcium ion and sodium and potassium adenosine triphosphatase: its mechanism of inhibition and identification of E_1-P intermediate.
Mol. Pharmacol. 9 336

Tobin,T.; Brody,T.M. (1972)
Rates of dissociation of enzyme-ouabain complexes and $K_{0.5}$ values in $(Na^+ + K^+)$ adenosine triphosphatase fron different species.
Biochem. Pharmacol. 21 1553

Tobin,T.; Henderson,R.; Sen,A.K. (1972)
Species and tissue differences in the rate of dissociation of ouabain from (Na^++K^+)-ATPase.
Biochim. Biophys. Acta **274** 551

Towle,D.W. (1974)
Equivalence of gill Na^++K^+-ATPases from blue crab acclimated to high and low salinity.
Am. Zool. **14** 1259

Truchot,J.-P. (1981)
The effect of water salinity and acid-base state on the blood acid-base balance in the euryhaline crab, Carcinus maenas.
Comp. Biochem. Physiol. **68A** 555

Wanson,S.A.; Pequeux,A.; Roer,R.D. (1984)
Na^+ regulation and (Na^++K^+)ATPase activity in the fiddler crab Uca minax (Le conte).
Comp. Biochem Physiol. **79A** 673

Warnock,D.G.; Reenstra,W.W.; Yee,V.J. (1982)
Na^+/H^+ antiporter of brush border vesicles: studies with acridine orange uptake.
Am. J. Physiol. **242** 733

Weiland,A.L.; Magnum,C.P. (1975)
The influence of environmental salinity on hemocyanin function in the blue crab, Callinectes sapidus.
J. exp. Zool. 193 265

Weinmann,H.J. (1980)
Die Phospholipidzusammensetzung einer definierten Plasmamembranfraktion des Haushuhnes Gallus domesticus und deren Interaktion mit Membrangebundenen Enzymen während Entwicklung und Alterung.
Dissertation FU-Berlin

Wolf,H.U; Adolf,L. (1969)
Untersuchungen über eine Mg^{2+}-(Ca^{2+})-aktivierte ATPase aus Rinderhirnmikrosomen.
Eur. J. Biochem. **8** 68

Yves,H.E.; Yee,V.J.; Warnock,D.G. (1983a)
Mixed type inhibition of the renal Na^+/H^+ antiporter by and amiloride. Evidence for a modifier site.
J. Biol. Chem. 258 9710

Yves,H.E.; Yee,V.J.; Warnock,D.G. (1983b)
Asymmetric distribution of the Na^+/H^+ antiporter in the renal proximal tubule epithelial cell.
J. Biol. Chem. 258 13513

Zanders,I.P. (1981)
Control and dynamics of ionic balance in Carcinus maenas.
Comp. Biochem. Physiol. **70A** 457

Lebenslauf

27.02.1951	geboren in Berlin als Sohn von Kurt und Marie Bigalke
April 1958	Einschulung in die Johann-Peter-Hebel-Schule in Berlin Wilmersdorf
April 1959	Umschulung in die Conrad-Schule in Berlin Zehlendorf
April 1964	Übergang auf die Malwida-von-Meysenbug-Schule (spätere Werner-von-Siemens-Oberschule) in Berlin Zehlendorf
April 1969	Übergang auf den sozialwissenschaftlichen Zweig der Fichtenberg-Oberschule in Berlin Steglitz
Jan. 1972	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife an der Fichtenberg-Oberschule
April 1972	Beginn des Studiums der Publizistik an der FU-Berlin
Okt. 1972	Beginn des Studiums der Biologie an der FU-Berlin
Mai 1976	Vordiplom in Biologie
April 1977	Beschäftigung als stud. Tutor am Institut f. Tierphysiologie am FB 23 der FU-Berlin
April 1980	Beschäftigung als stud. Mitarbeiter in einem DFG Projekt am Institut f. Tierphysiologie am FB 23 der FU-Berlin
Okt. 1980	Diplom in Biologie am FB 23 der FU-Berlin
WS 80/81	Lehrbeauftragter am Institut f. Tierphysiologie

April 1981	Anstellung als wiss. Mitarbeiter am Institut f. Tierphysiologie am FB 23 der FU-Berlin
Juni 1986	Anstellung als wiss. Mitarbeiter in einem DFG-Projekt am Institut f. Tierphysiologie am FB 23 der FU-Berlin